

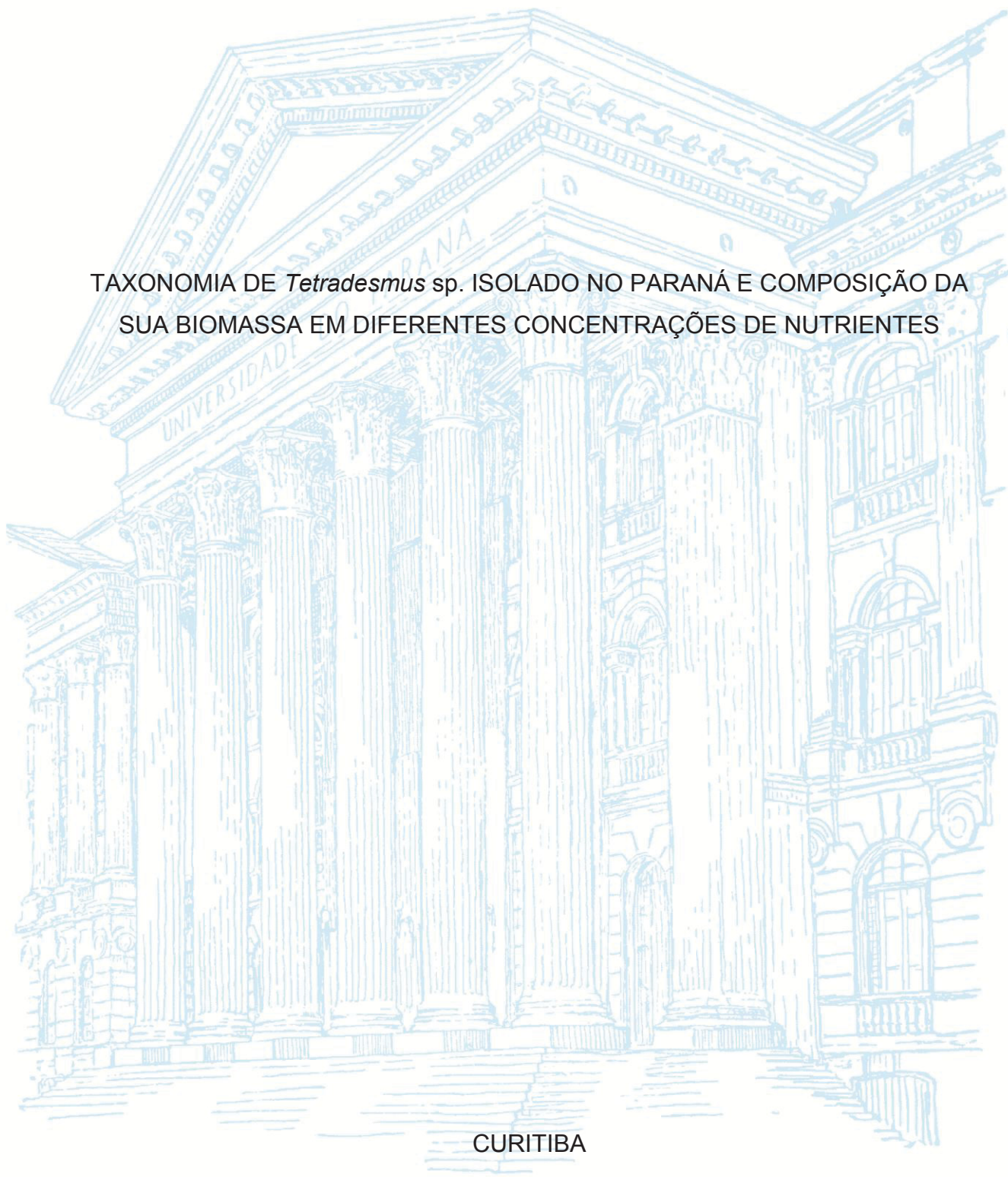
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PALOMA GERLACH RIBAS

TAXONOMIA DE *Tetrademus* sp. ISOLADO NO PARANÁ E COMPOSIÇÃO DA  
SUA BIOMASSA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES

CURITIBA

2020



PALOMA GERLACH RIBAS

TAXONOMIA DE *Tetrademus* sp. ISOLADO NO PARANÁ E COMPOSIÇÃO DA  
SUA BIOMASSA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestre em  
Genética, Programa de Pós-Graduação em  
Genética, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Merlo Kava

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Ribas, Paloma Gerlach

Taxonomia de *Tetrademus* sp. isolado no Paraná e composição da sua biomassa em diferentes concentrações de nutrientes. / Paloma Gerlach Ribas. – Curitiba, 2020.

68 p.: il.

Orientadora: Vanessa Merlo Kava

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Microalga. 2. Alga verde. 3. Taxonomia. 4. Morfologia (Biologia). 5. Macromolécula. 6. Biotecnologia. I. Título. II. Kava, Vanessa, 1968-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 579.839

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **PALOMA GERLACH RIBAS** intitulada: **TAXONOMIA DE *Tetrademus* sp. ISOLADO NO PARANÁ E COMPOSIÇÃO DA SUA BIOMASSA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES**, sob orientação da Profa. Dra. VANESSA MERLO KAVA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Julho de 2020.

Assinatura Eletrônica

05/08/2020 12:02:56.0

VANESSA MERLO KAVA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/08/2020 19:36:47.0

JOAO ALENCAR PAMPHILE

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)

Assinatura Eletrônica

05/08/2020 12:04:44.0

DANIELE PRISCILA DA CONCEIÇÃO HAMMER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais pelo incentivo e apoio.

À Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Kava pela paciência e carinho dedicados à execução deste projeto.

À Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thelma Veiga Ludwig e à mestrande Paula Carolina Ferreira por todo auxílio e dedicação no decorrer deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Daiani Savi e Douglas Adamoski por se disponibilizarem a auxiliar e tirar as dúvidas que surgiram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao NPDEAS por disponibilizar o Laboratório de Biotecnologia e Cromatografia.

Aos colegas do laboratório LabGeM Gustavo, Raquel, Isabelle, Tairine, Franciele, Daniele Conceição e Matheus por toda ajuda.

Agradeço especialmente à Beatriz Santos pela ajuda, pelos conselhos, pela paciência e por toda dedicação.

Ao meu querido amigo Guilherme Burgel, não só pela parceria e dedicação na Universidade, mas também pela amizade e carinho na vida fora dela.

Às minhas amigas Viviana Gagosian e Bruna Luz pelo apoio e amizade.

Ao meu esposo Daniel pelo amor, incentivo e todo suporte emocional que sempre me dedicou. Agradeço também por todo auxílio e companhia em laboratório.



## RESUMO

Microalgas apresentam capacidade de se desenvolver em diferentes condições de temperatura, salinidade, disponibilidade de nutrientes e intensidades luminosas, permitindo seu bom desenvolvimento em cultivos em laboratório em pequena e grande escala. Têm sido foco de grande destaque em pesquisas visando sua aplicação na indústria biotecnológica. Apresentam um grande número de espécies, porém há uma limitação na correta identificação, pois esta ainda depende quase que exclusivamente de análises morfológicas. A identificação de microalgas por meio de metodologias que envolvam análises moleculares ainda está em desenvolvimento, na busca por sequências informativas para este grupo polifilético, visando contribuir para uma identificação robusta quando associada a estudos de morfologia. Decorrente destes estudos associados, a taxonomia de vários gêneros de interesse biotecnológico está sendo revista. As microalgas produzem em sua biomassa compostos com aplicações biotecnológicas como pigmentos, lipídios, carboidratos e proteínas. Dentre estas, destaca-se o gênero *Tetradismus* pela sua capacidade de produção de biomassa e por conter macromoléculas de interesse, principalmente lipídeos e carboidratos. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo identificar e avaliar o potencial biotecnológico para a produção de carboidratos, lipídeos e pigmentos pelo isolado *Tetradismus* LGMM12, isolado da represa do Iraí – PR. Para a identificação taxonômica deste isolado foram realizadas análises morfológicas, por microscopia de luz e eletrônica de varredura, e moleculares, por sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal. A morfologia do isolado LGMM12 é compatível com o gênero *Tetradismus*, pois apresenta células fusiformes, formação de cenóbios com morfologia típica de disposição das células. Na análise molecular, foi gerada uma árvore filogenética por inferência bayesiana com sequências da região ITS das espécies disponíveis de *Tetradismus* no banco de dados *GenBank*. Na árvore gerada, o isolado LGMM12 formou um ramo isolado, indicando se tratar de uma nova espécie de *Tetradismus*. Nas análises de composição de biomassa de LGMM12 foram utilizadas diferentes concentrações de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) no meio de cultivo CHU, em um total de 12 combinações. O tratamento composto por 5g/L de glicerol como fonte de C, metade da concentração padrão de P (0,125 g/L) e o dobro da concentração padrão de N (0,5 g/L) apresentou produtividade diária de 0,09 g/L de biomassa e o tratamento composto por 5g/L de glicerol, 0,5 g/L de N e 0,5 g/L de P apresentou produtividade diária de 0,10 g/L de biomassa. Foi observado que o isolado LGMM12 teve uma produção de carboidratos superior a 30% na biomassa seca em nove tratamentos testados e no controle. Para a produção de lipídeos a condição composta por 10g/L de glicerol, 0,125 g/L de N e 0,125 g/L de P possibilitou a recuperação de 26% de lipídeos da biomassa seca. A condição composta por 0,5 g/L de N, 0,25 g/L de P e ausência de C, possibilitou a recuperação de 2,83% de clorofila da biomassa seca deste isolado. Concluindo, *Tetradismus* LGMM12 possui capacidade para produzir macromoléculas de interesse biotecnológico, e esta produção é modulada por alterações nas condições de cultivo, fornecendo uma base para estudos futuros que visem potencializar a produção de moléculas de interesse.

Palavras-chave: Taxonomia molecular; *Tetradismus*; Bioprodutos; ITS, Inferência Bayesiana

## ABSTRACT

Microalgae can grow under different temperature, salinity, nutrients, and luminous intensities, allowing their development in small and large scale laboratory crops. They have been the focus of research due to their application in the biotechnology industry. This polyphyletic group has a large number of species, but the correct identification still depends almost exclusively on morphological analysis. The identification of microalgae using molecular analysis is being developed to contribute to a robust identification when associated with morphology studies. As a result of these studies, the taxonomy of several genera of biotechnological interest is being revised. Microalgae produce compounds in their biomass with biotechnological applications such as pigments, lipids, carbohydrates, and proteins. The genus *Tetradesmus* stands out for its biomass production and contains macromolecules of interest, mainly lipids, and carbohydrates. In this sense, this work aimed to identify and evaluate the biotechnological potential for the carbohydrates, lipids, and pigments production by the *Tetradesmus* LGMM12, isolated from the Iraí dam - PR. For the taxonomic identification of this isolate, morphological analysis was performed, using light and scanning electron microscopy, and molecular analysis, by sequencing the ITS region of the ribosomal DNA. The isolate LGMM12 morphology is compatible with the genus *Tetradesmus*, as it presents spindle cells, the formation of cenobes with the typical cell disposition. A phylogenetic tree was generated by Bayesian inference with ITS sequences from *Tetradesmus* species in the GenBank database. In the generated tree, the isolate LGMM12 formed an isolated branch, indicating a new species of *Tetradesmus*. The biomass composition analysis of LGMM12 was performed at 12 combinations of different concentrations of carbon (C), nitrogen (N), and phosphorus (P) using CHU culture medium as a basis. The treatment consisting of 5 g / L of glycerol as a source of C, half the standard concentration of P (0.125 g / L) and twice the standard concentration of N (0.5 g / L) showed daily productivity of 0.09 g / L of biomass and the treatment composed of 5 g / L of glycerol, 0.5 g / L of N and 0.5 g / L of P showed daily productivity of 0.10 g / L of biomass. It was observed that the LGMM12 had a carbohydrate production above 30% in the dry biomass of nine treatments tested and in control. For the production of lipids, the condition composed of 10g / L of glycerol, 0.125 g / L of N, and 0.125 g / L of P enabled the recovery of 26% of lipids from the dry biomass. The condition composed of 0.5 g / L of N, 0.25 g / L of P, and absence of C, allowed the recovery of 2.83% of chlorophyll from the dry biomass. In conclusion, *Tetradesmus* LGMM12 can produce macromolecules of biotechnological interest, and changes in culture conditions modulate this production. This information can provide a basis for future studies that aim to enhance the production of these molecules.

Keywords: Molecular taxonomy; *Tetradesmus*; Bioproducts; ITS, Bayesian inference

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA ESPÉCIE TIPO DO GÊNERO <i>Tetradasmus</i> ( <i>Tetradasmus wisconsinensis</i> ).....	17
FIGURA 2- CULTIVO MIXOTRÓFICO DE MICROALGAS COM ALTERAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES E BIOPRODUTOS FORMADOS.....	21
FIGURA 3- PROCEDIMENTOS INICIAIS PARA O CULTIVO DO ISOLADO LGMM12 EM DIFERENTES FORMULAÇÕES DE CHU.....	32
FIGURA 4- IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO ISOLADO LGMM12 APÓS 7 DIAS DE CULTIVO A 24°C, EM MEIO TAP.....	39
FIGURA 5- IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓTICA DO ISOLADO LGMM12 APÓS 7 DIAS DE CULTIVO A 24°C, EM MEIO TAP.....	40
FIGURA 6- ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA POR INFERÊNCIA BAYESIANA PARA SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS DE <i>Tetradasmus</i> spp.....	42
FIGURA 7- DESTAQUE DAS SEQUÊNCIAS IDENTIFICADAS EQUIVOCADAMENTE NOS BANCOS DE DADOS, QUE ALINHAM COM A ESPÉCIE <i>T. obliquus</i> .....	43
FIGURA 8- PRODUÇÃO DE BIOMASSA NOS TRATAMENTOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE C, N e P APÓS 16 DIAS DE CULTIVO DE LGMM12.....	46
FIGURA 9- CARBOIDRATOS (%) RECUPERADOS NA BIOMASSA SECA APÓS 16 DIAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS UTILIZADOS NO CULTIVO DE LGMM12.....	48
FIGURA 10- LIPÍDEOS (%) RECUPERADOS NA BIOMASSA SECA APÓS 16 DIAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS UTILIZADOS NO CULTIVO DE LGMM12.....	50



FIGURA 11 - CLOROFILA (%) RECUPERADA NA BIOMASSA SECA APÓS 16 DIAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS UTILIZADOS NO CULTIVO DE LGMM12.....51

FIGURA 12- PORCENTAGEM DE BIOPRODUTOS RECUPERADOS NA BIOMASSA SECA DE CADA TRATAMENTO APÓS 16 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA ALTERADO.....52

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR E PRODUTOS DE ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES GRUPOS DE MICROALGAS.....	24
QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO TAP.....	29
QUADRO 3 - <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS, TEMPERATURA DE ANELAMENTO E REFERÊNCIAS.....	30
QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO CHU PADRÃO E VARIAÇÕES UTILIZADAS.....	32
QUADRO 5- TRATAMENTOS COM SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES DE CARBONO, FÓSFORO E NITROGÊNIO.....	33
QUADRO 6- COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO ISOLADO LGMM12 E DE ESPÉCIES PRÓXIMAS.....	39
QUADRO 7- ESPÉCIES DE <i>Tetrademus</i> COM SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS DISPONÍVEIS NO BANCO DE DADOS GENBANK.....	44
QUADRO 8- PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA (g/L) POR <i>Tetrademus</i> LGMM12 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES EM MEIO CHU.....	45
QUADRO 9- COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA SECA DO ISOLADO LGMM12 APÓS 16 DIAS DE CULTIVO EM MEIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES.....	47

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
2.1 MICROALGAS .....	13
2.2 FAMÍLIA Scenedesmaceae.....	14
2.3 GÊNERO <i>Tetradismus</i> .....	15
2.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE <i>Tetradismus</i> .....	16
2.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>Tetradismus</i> sp.....	17
2.6 CULTIVO DE MICROALGAS.....	18
2.6.1 Nutrientes.....	20
2.7 IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DO GÊNERO <i>Tetradismus</i> .....	22
2.8 BIOPRODUTOS DE MICROALGAS.....	23
2.8.1 Carboidratos.....	23
2.8.2 Lipídeos.....	24
2.8.3 Pigmentos.....	25
2.9 PESQUISA DE MICROALGAS NPDEAS-UFPR.....	26
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	28
4.2 IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO LGMM12.....	28
4.2.1 Identificação Morfológica.....	28
4.2.2 Purificação e quantificação de DNA.....	29
4.2.3 Taxonomia molecular baseada no sequenciamento do DNA.....	29
4.3 TESTES COM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	31
4.4 PRÉ-CULTIVO.....	31
4.5 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA SECA.....	33
4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	34
4.7 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS.....	35
4.8 QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS.....	36
4.9 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS.....	37
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>

5.1 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA.....	38
5.2 5.2 TAXONOMIA MOLECULAR.....	40
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	45
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	47
5.4.1 Carboidratos.....	47
5.4.2 Lipídeos.....	49
5.4.3 Pigmentos.....	50
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
ANEXO 1.....	67
ANEXO 2.....	68

## 1. INTRODUÇÃO

A busca por microalgas com potencial biotecnológico encontra desafios quanto à identificação dos isolados recuperados no ambiente, uma vez que a identificação destes organismos é baseada, majoritariamente, em análises morfológicas. Todavia, estudos mais recentes de taxonomia têm unido análises morfológicas e análises moleculares, fornecendo informações mais consistentes quanto à história evolutiva de cada gênero e suas respectivas espécies. A bioprospecção e subsequente identificação de isolados de microalgas do ambiente fornecem à indústria, alternativas renováveis e mais sustentáveis de fonte de moléculas com aplicabilidade industrial.

Microalgas do gênero *Tetrademus* são de fácil manipulação em laboratório e apresentam potencial para a produção de biomassa rica em uma série de macromoléculas de interesse biotecnológico, como lipídeos, carboidratos, pigmentos e proteínas (DI CAPRIO *et al.*, 2019). Isolados deste gênero são utilizados pela equipe de pesquisa do Laboratório de Genética de Micro-organismos (LabGeM) e Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) da Universidade Federal do Paraná.

Para que os bioprodutos de microalgas possam ser aplicados em escala industrial, busca-se entender o metabolismo e a fisiologia destes organismos visando encontrar as condições ideais de cultivo que potencializam a produção de moléculas de interesse. Alterações no fornecimento de nutrientes para o cultivo de microalgas tem se mostrado eficientes para potencializar a produção de moléculas como carboidratos e lipídeos.

Desta maneira, este trabalho buscou entender as respostas fisiológicas de uma microalga nativa do Paraná frente ao cultivo com diferentes concentrações de três principais nutrientes (Nitrogênio, Fósforo e Carbono). Observou-se o efeito das alterações na produção de biomassa, carboidratos, lipídeos e pigmentos. Além disso, foi realizada a identificação desta microalga por meio de caracterização morfológica e sequenciamento de DNA.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MICROALGAS

Microalgas são, em sua maioria, autotróficas (BICUDO, MENEZES, 2006), todavia, alguns organismos podem ser secundariamente heterotróficos ou mixotróficos (TUCHMAN, 1996). Habitam principalmente ambientes aquáticos de água doce, salgada ou estuários (BICUDO, MENEZES, 2006).

As microalgas são responsáveis por cerca de 60% da produção primária de energia do planeta, transformando, por meio da fotossíntese, energia luminosa em energia química (RAVEN *et al.*, 2001), além de apresentarem grande importância na fixação de carbono (BELLINGER, SIGEE, 2010).

As microalgas apresentam características morfológicas (cloroplastos, ultraestrutura celular), bioquímicas (pigmentos, ácidos graxos) e fisiológicas (ciclo de vida) bastante diversificadas, as quais, muitas vezes, são utilizadas para diferenciar entre os milhares de espécies existentes desses organismos (ANDERSEN, 2004). Podem, ainda, ser diferenciadas de acordo com a sua produção de pigmentos, Chlorophytas (algas verdes), Cyanophytas (algas azuis), Chrysophytas e Bacillariophytas (algas douradas), Phaeophytas (algas castanhas) e Rhodophytas (algas vermelhas) (JOHN, WHITTON, BROOK, 2002).

O filo das Chlorophytas ou algas verdes abriga quatro classes, sendo elas Micromonadophyceae, Charophyceae, Ulvophyceae e Chlorophyceae (TOMASELLI, 2004). As Chlorophytas são microalgas eucariontes, que podem ser encontradas nas formas unicelular, colonial, filamentosa, ou com variações destas morfologias (BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

As Chlorophytas apresentam clorofilas A e B, vários carotenóides e podem formar e armazenar amido e ácidos graxos em seus cloroplastos (TOMASELLI, 2004). Além disso, possuem sua parede celular composta por celulose e outros polímeros, características que despertam grande interesse comercial e biotecnológico para o estudo destes organismos (REVIERS, 2010).

Além das características morfológicas, estudos utilizando análises moleculares têm sido utilizadas para sua classificação. Inicialmente, a classificação molecular de microalgas se baseou em estudos comparativos da região 16S do



RNAr de uma série de organismos (WOESE *et al.*, 1990). Atualmente, com o avanço das técnicas moleculares, a identificação das microalgas em nível de espécie conta com análises conjuntas de características genéticas, morfológicas e fisiológicas (KOVAČEVIĆ *et al.*, 2010).

## 2.2 FAMÍLIA Scenedesmaceae

A família Scenedesmaceae foi descrita por Oltmanns em 1904, pertence ao filo das Chlorophytas, classe Chlorophyceae. Hegewald *et al.* (2010) haviam subdividido a família em cerca de 29 gêneros, todavia Krienitz, Bock (2012) por meio de estudos moleculares reconheceram apenas 13 gêneros, dentre eles *Acutodesmus*, *Desmodesmus*, *Scenedesmus* e *Tetradasmus*.

Os organismos da família Scenedesmaceae podem ser encontrados comumente em águas continentais ao redor do globo, apresentando grande plasticidade morfológica (JOHNSON *et al.*, 2007). São caracterizados por sua capacidade de formar cenóbios, muitas vezes com 4 células, que podem estar dispostas em um ou mais planos (KOMÁREK, FOTT, 1983). A parede celular desses organismos é formada por uma camada interna de celulose e outra (ou várias outras) de esporopolenina (ATKINSON *et al.* 1972), sendo que na camada mais externa podem apresentar ornamentações. O formato das células é variado, sendo encontradas células cocóides, elípticas, fusiformes e lunadas (GODINHO, 2009).

O gênero *Scenedesmus* inicialmente abrigava os gêneros *Acutodesmus* e *Desmodesmus* como subgêneros, sendo que organismos do gênero *Tetradasmus* eram identificados como pertencentes ao subgênero *Acutodesmus* (OLIVEIRA, 2015).

Nas últimas décadas, estudos combinados de microscopia eletrônica e análises moleculares baseados principalmente nas regiões genômicas 18S rDNA e ITS-2 rDNA abriram o gênero *Scenedesmus* e elevaram os subgêneros *Acutodesmus* (TSARENKO, PETLEVANNY, 2001) e *Desmodesmus* (AN *et al.*, 1999) a gênero.

### 2.3 GÊNERO *Tetradismus*

O gênero *Tetradismus* foi descrito inicialmente por Smith (1913) baseado apenas na espécie *Tetradismus wisconsinensis* a partir de cultivo preparado em laboratório. Todavia, a espécie apresentou semelhanças com a espécie *Scenedesmus acutus* Meyen (1829), desta maneira CHODAT (1926) fundiu a espécie ao gênero *Scenedesmus* baseado na observação da grande variabilidade encontrada nos organismos desde gênero quando cultivados em diferentes condições.

Fott, Komárek (1983) reconheceram o gênero *Tetradismus* novamente, ao qual incluíram a espécie *Tetradismus cumbricus*. Contudo Hegewald, Haganata (2000) incluíram *Tetradismus* como sinônimo do subgênero *Acutodesmus*.

Posteriormente, utilizando técnicas moleculares Tsarenko, John (2011) analisaram as relações taxonômicas entre *Acutodesmus*, *Desmodesmus* e *Scenedesmus* utilizando análises de ITS-2 (*Internal Transcribed Spacer*) rDNA, servindo como base para estudo realizado por Wynne, Hallan (2015), que reintegraram a nomenclatura original proposta por Smith (1913), recuperando espécies ao gênero *Tetradismus*.

Algumas espécies atualmente identificadas como *Tetradismus* ainda podem ser encontradas na literatura como *Acutodesmus* ou *Scenedesmus*, como *Acutodesmus obliquus* e *Scenedesmus dimorphus*, embora bancos de dados como o *Algae base* as reconheça como pertencentes ao gênero *Tetradismus* (GUIRY, GUIRY, 2015).

Os desafios encontrados para identificação das espécies de microalgas podem estar relacionados à sua grande plasticidade fenotípica, além disso, por muito tempo a identificação e análise das relações taxonômicas das Scenedesmaceae eram baseadas somente em características morfológicas.

As análises morfológicas são de grande importância para a identificação dos mais diversos organismos, todavia, a presença de homoplasias pode fazer com que organismos diferentes sejam identificados como pertencentes à mesma espécie.

Concomitantemente, hábitos de vida (POTTER *et al.* 1997), reprodução assexuada (que pode manter mutações), existência de espécies crípticas (KRIENITZ *et al.* 2001), são fatores importantes que tornam a identificação taxonômica de

microalgas cada vez mais desafiadora de ser realizada somente pela análise morfológica destes organismos. Desta maneira, estudos simultâneos entre análises moleculares e morfológicas para a identificação taxonômica se fazem cada vez mais necessárias.

## 2.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Tetradismus*

A análise morfológica de identificação taxonômica clássica, utilizada por autores como Fott, Komárek (1974), se baseia na observação de características como a capacidade das microalgas em formarem ou não cenóbios (colônias), a forma de alinhamento dos cenóbios (um ou mais planos de alinhamento), número de células que formam o cenóbio (2,4,6 ou mais células), disposição das células no cenóbio e forma com que se unem umas às outras (por uma ou ambas as extremidades, paralelas, inclinadas, lineares). Além disso, também são observadas características como a presença e o tipo de ornamentação existente na parede celular externa (GODINHO, 2009).

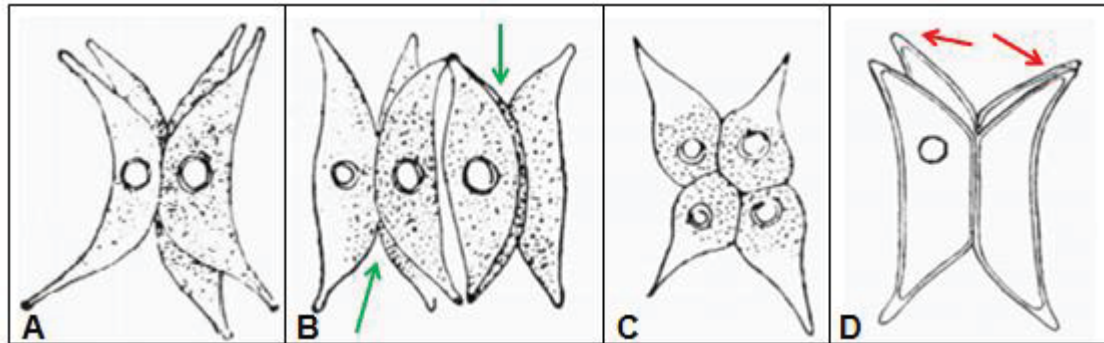
A morfologia do gênero *Tetradismus* geralmente se caracteriza por células com formato fusiformes e lunado (FIGURA 1-A), formando cenóbios com 2 a 4 células dispostas em diferentes planos (FIGURA 1-A). As células se unem através das margens convexas (FIGURA 1-B), formando um padrão cruciforme em vista apical (FIGURA 1-C). Com ápices pontiagudos a arredondados, que se curvam na direção oposta ao cenóbio (FIGURA 1-D)(GODINHO, 2009).

Atualmente a lista das espécies descritas para o gênero *Tetradismus* pode ser encontrada no banco de dados *Algae Base* ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)). Existem 26 nomes de espécie no banco de dados, sendo 9 deles intraespecíficos e 14 delas aceitas taxonomicamente (GUIRY, GUIRY, 2020).

A análise das características morfológicas das espécies listadas mostra espécies com padrões variados de formato celular, com formas elipsoides (*T. crocinii* (FOTT, KOMAREK, 1974); *T. dissociatus* (VERSES, TRAINOR, 1966)), formas fusiformes (*T. bernardii* (SMITH, 1916); *T. dimorphus* (TURPIN, 1828)). São descritas também espécies que não formam cenóbios, como *T. adustus* (TERLOVA, LEWIS, 2019), *T. deserticola* (LEWIS, FLECHTNER, 2004), entre outras. Tais variações

morfológicas demonstram a grande variabilidade fenotípica encontrada nos indivíduos do gênero *Tetradismus*.

FIGURA 1- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA ESPÉCIE TIPO DO GÊNERO  
*Tetradismus* (*Tetradismus wisconsinensis*)



Legenda: Figura A mostrando o formato lunado das células unidas formando um cenóbio de 4 células. Figura B, flechas verdes apontando a união das células através das margens convexas. Figura C mostrando a vista apical do cenóbio, evidenciando o formato cruciforme. Figura D, flechas vermelhas apontando para os ápices com formato pontiagudos das células.

FONTE: Adaptado de FOTT, KOMÁREK, 1974.

## 2.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Tetradismus* sp.

Para que as análises genéticas sejam eficientes na identificação de microalgas em nível de espécie, é indispensável utilizar regiões do DNA suficientemente informativas (EVANS *et al.* 2007). Um *barcode* eficaz de DNA, por exemplo, precisa conter regiões flangeadoras conservadas, facilitando desenho de *primers* (MACGILLIVARY, KACZMARSKA, 2011).

A utilização de *COX I* (*cyclooxygenase-1*) para algas verdes não se mostrou muito eficaz por ser uma região muito variável, exigindo a utilização de *primers* diferentes para cada táxon (FUČÍKOVÁ *et al.* 2011), além de apresentar muitas regiões intrônicas que tornam o desenho de novos *primers* uma tarefa complicada (TURMEL *et al.* 2002; SAUNDERS, KUCERA 2010). Embora muito utilizado, o gene *18S rDNA* exige a utilização de outros genes para auxiliar na identificação das relações filogenéticas em algas verdes (FUČÍKOVÁ *et al.* 2011). O gene *rbcL* (*large subunit of Ribulose Biphosphate Carboxylase*), utilizado em alguns estudos para macroalgas verdes marinhas mostra-se um potencial marcador para microalgas

verdes. Contudo, também pode apresentar muitos íntrons, o que pode dificultar a sua aplicação para taxonomia de microalgas (HANYUDA *et al.*, 2000). O fator de alongamento plastidial (*tufA*) também vem sendo usado como potencial marcador para análises filogenéticas em espécies de algas verdes, porém sua eficácia ainda não foi confirmada (FAMA *et al.*, 2002).

Outras regiões muito utilizadas e que apresentaram eficácia na identificação de algas verdes são ITS1 e ITS2 do rDNA (ANet *et al.* 1999, VAN HANNEN *et al.* 2000, 2002, HEGEWALD, WOLF 2003, JOHNSON *et al.*, 2007; ZOU *et al.*, 2016, TERLOVA, LEWIS, 2019).

JOHNSON *et al.*, (2007), por exemplo, analisaram 100 cultivos e isolaram 24 tipos de sequências diferentes, correspondendo a diferentes unidades taxonômicas. Tais resultados foram superiores aos obtidos nas análises morfológicas em microscópio óptico, demonstrando a eficácia da análise utilizando a região ITS na identificação de microalgas da família Scenedesmaceae, a qual pertence o gênero *Tetradismus*.

A identificação molecular do gênero *Tetradismus* atualmente tem sido realizada principalmente por análise das regiões ITS1 e ITS2 (ANet *et al.*, 1999; VAN HANNEN *et al.*, 2002; LEWIS E FLECHTNER, 2004; BUCHHEIM *et al.*, 2011), e parte das regiões ribossomais 5,8S e 18S (TERLOVA, LEWIS, 2019).

Algumas espécies do gênero *Tetradismus* identificadas molecularmente utilizando a região ITS são *Tetradismus deserticola* (LEWIS, FLECHTNER, 2004); *Tetradismus bajacalifornicus* (LEWIS, FLECHTNER, 2019), entre outras.

A espécie *Tetradismus obliquus*, amplamente pesquisada por seu potencial na produção de macromoléculas de interesse industrial, teve seu genoma completo sequenciado por Carreres *et al.*, 2017, abrindo caminho para uma série de pesquisas voltadas ao melhoramento genético e identificação de genes de interesse.

## 2.6 CULTIVO DE MICROALGAS

Muitas microalgas apresentam grande capacidade de adaptação, o que torna seu cultivo em laboratório bastante acessível. A produção de moléculas de interesse pelas microalgas também pode estar relacionada a fatores ambientais e de cultivo,

fatores como a privação de nutrientes, alterações no pH, temperatura e incidência de luz podem afetar diretamente a produtividade (WASE *et al.*, 2018).

O cultivo de microalgas pode ser realizado principalmente por meio de sistemas abertos, como tanques ou sistemas fechados, como os fotobiorreatores (KUMAR *et al.* 2011). Os sistemas fechados permitem ao pesquisador um controle maior das variáveis que afetam o crescimento. Pois a intensidade de luz é mais bem distribuída, a temperatura, a adição de nutrientes e a injeção de CO<sub>2</sub> podem ser controladas, além disso, cultivos fechados são menos suscetíveis a contaminantes como bactérias e fungos, por exemplo. Entretanto, esse sistema ainda possui custos elevados de manutenção e necessita manuseio por mão de obra especializada (UGWU, AOYAGI, UCHIYAMA, 2008). O cultivo em tanques, apesar de mais atrativo economicamente, não permite ao pesquisador o total controle dos parâmetros de cultivo (STEPHENSON *et al.* 2011).

As microalgas geralmente são cultivadas em sistemas fotoautotróficos, no entanto, a possibilidade de outras formas de cultivo como heterotróficos e mixotróficos podem elevar a produtividade e reduzir os custos de produção de biomassa. Segundo Ren *et al.* (2013) o cultivo heterotrófico permite que as microalgas acumulem mais biomassa e produzam maior quantidade de lipídeos em menos tempo. Além disso, a redução dos custos ocorre, pois, o cultivo heterotrófico pode ser realizado em reatores independentes de luz, além de permitir o uso de águas residuais, dejetos zootécnicos, esgotos urbanos, entre outras como fonte de carbono e outros nutrientes. O uso de águas residuais para o cultivo heterotrófico torna-se promissor quando considerada a sustentabilidade econômica e ambiental do processo (DICAPRIO *et al.* 2019).

Quando utilizado, o cultivo heterotrófico encontra alguns desafios, como a contaminação por bactérias e fungos, principalmente pela grande disponibilidade de carbono no meio. Desta maneira, algumas estratégias como a esterilização do meio de cultivo, dos materiais utilizados, a filtração dos gases fornecidos e o uso de antibióticos podem ser adotadas (DICAPRIO *et al.* 2019).

O cultivo de microalgas em laboratório permite o controle e padronização da temperatura de cultivo. Cultivos de larga escala em tanques e fotobiorreatores estão sujeitos às alterações sazonais e diurnas, que acabam sendo um fator limitante para a produção de biomassa e lipídeos, principalmente os ácidos graxos (SOARES, 2010).



Assim como a temperatura, a luminosidade é um fator importante no cultivo das microalgas. A incidência de luz recebida pelos organismos tem influência direta na fixação de carbono, produção de biomassa e taxa de crescimento das culturas (DERNER, 2006). Sendo que alterações na intensidade luminosa podem favorecer o crescimento das microalgas e potencializar a produção de pigmentos (DANESI *et al.*, 2004).

Altas luminosidades podem causar foto inibição (RICHMOND, 2004) e a absorção de luz pelas células depende de sua distribuição no meio de cultura (RUBIO *et al.*, 2003), já que o aumento da concentração celular pode levar ao autossombreamento (SOARES, 2010)

Para evitar fatores como o auto sombreamento, o cultivo realizado com agitação permite que a luminosidade atinja as células das microalgas do cultivo de forma mais homogênea (DANESI *et al.*, 2004).

#### 2.6.1 Nutrientes

Os meios de cultura devem ser produzidos permitindo a disponibilidade de micro e macronutrientes, equilibrando aqueles que são essencialmente necessários e aqueles que não afetam diretamente o crescimento dos organismos. Os macronutrientes são encontrados em maiores concentrações na composição das células, sendo eles carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, silício, potássio, fósforo, sódio, cálcio, enxofre e ferro (COSTA *et al.*, 2014).

Considerando a capacidade fotossintetizante das microalgas, a presença de uma fonte de carbono nos meios de cultivo não se faz necessária. Ao adicionar N e P no meio de cultivo o crescimento das microalgas pode ser potencializado, o que aumenta o consumo de C e conseqüentemente leva a alterações na relação entre C: N: P (COSTA *et al.*, 2014).

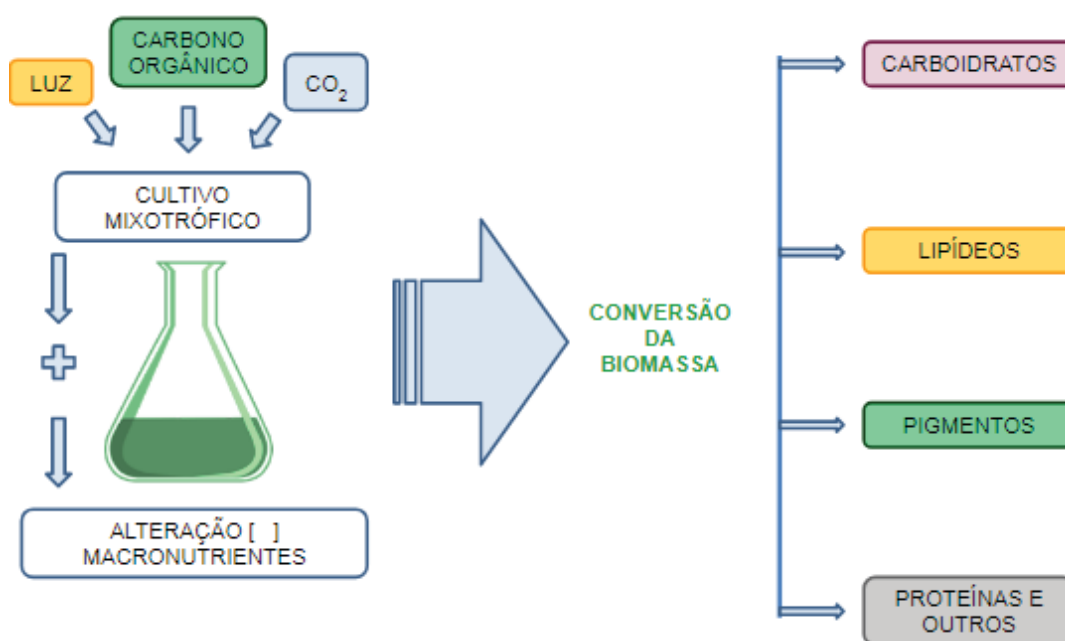
O carbono, por seu papel fundamental na fotossíntese, está relacionado ao crescimento das microalgas, conseqüentemente, a ausência ou diminuição da concentração de carbono implica na redução na taxa de crescimento e pigmentos nas células. Enquanto que o aumento na concentração deste nutriente pode levar ao acúmulo de ácidos graxos e aumento do conteúdo de carboidratos (BERMAN-FRANK, DUBINSKY, 1999).

Segundo Converti *et al.*, (2009), a deficiência de nitrogênio no cultivo leva ao aumento da biossíntese e acúmulo de lipídeos e triglicerídeos. Outro efeito seria a diminuição na fixação de dióxido de carbono e produção de clorofila.

A limitação do fósforo leva a redução na taxa de utilização de luz necessária para fixação de carbono e ao acúmulo de lipídeos e astaxantina (LI *et al.*, 2010). A deficiência de fósforo também demonstrou causar diminuição na taxa de clorofila, conteúdo proteico e crescimento de microalgas (KOBAYASHI, KAKIZONO, NAGAI, 1993).

Estudo realizado por Gao *et al.* (2018) com *Tetrademus bernardii*, demonstrou que cerca de 25 % do carbono no cultivo foi alocado para a produção de carboidratos e 19% para a produção de lipídeos. O mesmo estudo mostrou que quando cultivado em depleção de nitrogênio, a alocação de carbono ocorreu principalmente para a produção de carboidratos, chegando a 43%, e em depleção de fósforo a alocação de carbono ocorreu principalmente para a produção de lipídeos, chegando a 45%. Nota-se a importância da estequiometria entre C:N:P e sua relação fundamental com a produtividade das microalgas. Assim como, a adição de uma fonte de carbono ao sistema de cultivo pode potencializar a produção de moléculas de interesse (FIGURA 2).

FIGURA 2 - CULTIVO MIXOTRÓFICO DE MICROALGAS COM ALTERAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE MACRONUTRIENTES E BIOPRODUTOS FORMADOS



FONTE: A Autora, (2020).

## 2.7 IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DO GÊNERO *Tetradismus*

Na pesquisa biotecnológica, os indivíduos do gênero *Tetradismus* despertam interesse devido a sua grande capacidade adaptativa, tolerando diversas faixas de temperatura, pH e condições de cultivo. Tais características permitem seu cultivo e manipulação em laboratório e até mesmo em largas escalas de cultivo, em fotobiorreatores.

A grande adaptabilidade das microalgas deste gênero permite que sejam cultivadas em águas residuais, com dejetos, esgotos urbanos, entre outras condições estressantes e ainda assim manter sua capacidade de produzir biomoléculas (Di Caprio *et al.* 2019).

A facilidade do cultivo em laboratório permite entender melhor a cinética da produtividade de biomoléculas por organismos do gênero *Tetradismus*. Estudos demonstram a capacidade dos indivíduos deste gênero para a produção de lipídeos, como triacilgliceróis (TAG) e acúmulo de carotenoides (GRAMA *et al.*, 2014).

Indivíduos do gênero *Tetradismus* apresentam capacidade de acumular até 55% de seu peso seco na forma de lipídeos e até 40% na forma de amido, segundo estudos realizados por Breuer *et al.* (2014). Ainda, Pignolet *et al.* (2013) demonstraram que dependendo da condição de cultivo, foi possível observar a produção de até 60% do peso seco de *Tetradismus obliquus* na forma de proteínas. Outras moléculas de interesse produzidas por organismos desse gênero são pigmentos do tipo carotenóides, como astaxantinas (PIRASTRU *et al.* 2012).

Na corrida por alternativas sustentáveis para a produção de combustíveis, organismos do gênero *Tetradismus* ganham destaque não somente por seu potencial de produzir elevadas quantidades de lipídeos, entre eles os TAG para produção de biodiesel, mas também por sua capacidade de metabolizar hidrogênio, permitindo sua utilização na produção de biohidrogênio (VARGAS *et al.*, 2016). Rosa *et al.* (2019) em seu trabalho desenvolvido no NPDEAS-UFPR demonstrou capacidade do isolado de *Tetradismus obliquus* de produzir hidrogênio quando cultivado em meio TAP com depleção de enxofre.

## 2.8 BIOPRODUTOS DE MICROALGAS

As microalgas são seres ricos em pigmentos como clorofila e carotenóides, são fontes de inúmeras vitaminas, como nicotinato, biotina e vitaminas do complexo B (SPOLAORE *et al.*, 2006), também apresentam a capacidade de produzir lipídeos, como os triacilgliceróis (TAG) (JAEGER *et al.*, 2014). Segundo Bahadar, Khan, (2013) as microalgas possuem capacidade para a produção de moléculas que servem como matéria prima para a produção de vários tipos de combustíveis, como biometano, biodiesel e bioetanol. Também podem produzir ácidos graxos poli-insaturados, o que as tornam uma fonte alternativa para suplementar a alimentação tanto de humanos quanto animais (SPOLAORE *et al.*, 2006).

### 2.8.1 Carboidratos

A parede celular das microalgas de forma geral apresenta uma camada externa, que pode ser composta por polissacarídeos como pectina, ágar e alginato. Uma camada interna, composta principalmente por celulose, hemicelulose, glicoproteínas (YAMADA, SAKAGUCHI, 1982) e plastídios na forma de amido (RISMANI-YAZDI *et al.*, 2011) (QUADRO 1). A celulose e o amido da parede interna permitem a produção de polímeros de glicose, que são produtos de armazenamento de algumas microalgas (METTING, 1996).

Os carboidratos de microalgas apresentam baixo teor de lignina e alto teor de açúcares fermentáveis. Essas características permitem a utilização das microalgas na indústria da biotecnologia. Já foram reportadas a utilização de carboidratos provenientes de microalgas para a produção de biocombustíveis, como o bioetanol (CHEN *et al.*, 2013), aplicações terapêuticas e farmacêuticas ( $\beta$ -1,3-glucano), fabricação de alimentos e bebidas, produção de Agar gelificante, espessante, estabilizador e aditivo em alimentos (KOLLER, MUHR e BRAUNEGG, 2014).

QUADRO 1- COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR E PRODUTOS DE ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES GRUPOS DE MICROALGAS.

DIVISÃO	COMPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR	PRODUTO DE ARMAZENAMENTO
Cyanophyta	Lipossacarídeos, peptidoglicano	Amido
<b>Chlorophyta</b>	<b>Celulose, Hemicelulose</b>	<b>Amido, lipídeos</b>
Dinophyta	Ausência ou pouca celulose	Amido
Cryptophyta	Periplasto	Amido
Euglenophyta	Ausência	Paramilo, lipídeos
Rhodophyta	Agar, celulose, carbonato de cálcio, carragena	Amido florideano
Heterokontophyta	Escamas com altas quantidades de sílica	Leucosina, lipídeos

Nota: Em negrito, o filo ao qual pertence à microalga utilizada neste estudo.

FONTE: Adaptado de CHEN *et al.* ( 2013).

Indivíduos do gênero *Tetrademus* demonstram capacidade produtiva de carboidratos de cerca de 50 mg/L/dia em condições de cultivo com elevada concentração de nitrogênio (NADZIR *et al.*, 2019). Quando cultivado em águas contaminadas provenientes de rede de esgoto, foi observada uma produção de carboidratos de cerca de 60% pela microalga *T.obliquus* (MA *et al.*, 2018). Singh, Goyal e Moholkar, (2020), cultivando *T.obliquus* em meio de cultura BG-11, identificaram uma produção de carboidratos de cerca de 25%.

### 2.8.2 Lipídeos

As microalgas apresentam em média entre 1% e 70% de conteúdo lipídico em suas células, sendo que esse valor pode atingir até 90% do peso seco do organismo (SPOLAORE *et al.*, 2006).

Os lipídeos provenientes das microalgas são estudados como uma fonte sustentável para a produção de biocombustíveis e outros hidrocarbonetos (WASE *et al.*, 2018). Dentre os principais lipídeos produzidos por microalgas, pode ser citado o Triacilglicerol (TAG), o qual está intimamente relacionado ao armazenamento de carbono por esses organismos. O TAG é geralmente

armazenado em corpos oleosos citoplasmáticos e é uma das matérias primas para a produção de biodiesel (GRAMA *et al.*, 2014).

Devido às altas concentrações lipídicas identificadas para espécies do gênero *Tetrademus*, uma série de estudos vem sendo realizados visando potencializar a produção deste tipo de metabólito. Ferrigo *et al.*, (2015) identificaram uma composição lipídica de cerca de 47% em isolado da espécie *T.obliquus* cultivado em meio padrão. Em cepa de *T.obliquus* isolada de região subártica, foi identificada por Ismagulova *et al.* (2018), uma produção lipídica de até 40%.

Segundo Ren *et al.*, (2013), quando cultivado com deficiência de nitrogênio, *Tetrademus* sp. apresentou uma concentração lipídica de cerca de 53 %, ainda, Gao *et al.* (2018) identificaram para *Tetrademus bernardii* conteúdo lipídico de até 85% quando cultivado em depleção de nitrogênio e de até 77% em depleção de fósforo.

### 2.8.3 Pigmentos

As microalgas apresentam em sua composição grande quantidade de pigmentos fotossintetizantes, sendo os principais deles as Clorofilas A e B. Pigmentos acessórios como carotenoides, betacaroteno, luteína, astaxantinas, anteraxantina, zeaxantina, neoxantina, entre outros, também já foram isolados de diferentes espécies de microalgas (BROWN, JEFFREY, 1992).

Os pigmentos produzidos pelas microalgas podem ser utilizados em diversas áreas industriais, para aplicações alimentares, em produtos farmacêuticos e cosméticos, como corante para indústria têxtil e até mesmo tintas de impressão (DUFOSSÉ *et al.* 2005). Os pigmentos podem ser utilizados como uma fonte nutricional devido a grande quantidade de vitaminas A e E em sua composição. Na área farmacêutica, já foram demonstrados os efeitos anti-inflamatórios e anti-oxidantes dos pigmentos extraídos de microalgas (KOLLER, 2014).

A produção de pigmentos carotenóides por microalgas também tem sido foco de inúmeros estudos, uma de suas aplicações seria como um corante industrial alternativo, além de sua aplicabilidade na área estética (KOLLER, 2014). Alguns exemplos de sucesso são a produção em escala industrial de  $\beta$ -caroteno produzido por *Dunaliella salina* e astaxantina produzido por *Haematococcus pluvialis* (DUFOSSÉ *et al.* 2005).



O gênero *Tetradismus* é utilizado em inúmeros estudos pela sua capacidade de produção lipídica, todavia, resultados recentes têm demonstrado que espécies deste gênero também apresentam uma grande capacidade para a síntese de pigmentos, como  $\beta$ -caroteno e astaxantina.

Patnaik, Mallick (2015) por meio de cultivo mixotrófico de *T.obliquus* obtiveram cerca de 0,6 mg/100g de  $\beta$ -caroteno na biomassa seca do isolado. Gonçalves (2019) observou produção de 12,1 mg L<sup>-1</sup> de astaxantina, 12,8 mg L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -caroteno e 5,5 mg L<sup>-1</sup> de licopeno por *Tetradismus* sp. cultivado em meio BG-11 com alterações no pH. Singh *et. al* (2020) identificaram um rendimento de  $\beta$ -caroteno de 0,67mg/ g na biomassa seca de *T.obliquus*.

## 2.9 PESQUISA DE MICROALGAS NPDEAS-UFPR

O Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) fica localizado no campus politécnico da Universidade Federal do Paraná. Nele são realizadas pesquisas multidisciplinares focadas no entendimento da fisiologia e aplicação de tecnologias para a extração de bioprodutos de microalgas.

Os grupos de pesquisa são formados por diversas áreas de estudo, como Química, Engenharias Ambiental, Elétrica, Mecânica, Bioprocessos e Biotecnologia, além de pesquisadores da área de Genética e Bioquímica.

As pesquisas em larga escala são realizadas em fotobiorreatores tubulares compactos para o cultivo das microalgas, trazendo bons resultados na aplicabilidade de microalgas como *Tetradismus obliquus* para a produção de biocombustíveis, e ainda, a exploração de biomassa para produção de biogás, alimentação animal, entre outras (NPDEAS- <http://npdeas.blogspot.com/>).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar e avaliar o potencial biotecnológico para a produção de carboidratos, lipídeos e pigmentos pelo isolado *Tetrademus* LGMM12

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a morfologia do isolado LGMM12 por microscopia de luz e de varredura.
- Sequenciar a região ITS do DNA ribossomal do isolado LGMM12.
- Realizar a análise filogenética do isolado LGMM12 a partir da sequência de ITS obtida neste trabalho e com sequências de *Tetrademus* disponíveis em banco de dados.
- Combinar dados morfológicos e moleculares para identificação da espécie de LGMM12.
- Avaliar os efeitos fisiológicos da alteração das concentrações de carbono, nitrogênio e fósforo na produção de carboidratos, lipídeos e pigmentos pelo isolado LGMM12.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Este trabalho foi desenvolvido utilizando o isolado LGMM12, que pertence à coleção de microalgas do Laboratório de Genética de Micro-organismos (LabGeM) e foi coletado por Passos (2018) na Represa do Iraí (coordenadas S25° 25' 31,1" W49° 06' 22,7"), localizada na região metropolitana de Curitiba-PR. Estudos prévios indicaram que este isolado é promissor na produção de lipídeos e adaptável às condições de cultivo laboratorial.

### 4.2 IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO LGMM12

#### 4.2.1 Identificação Morfológica

O isolado foi identificado morfolologicamente por meio de microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura. Para as análises de microscopia ótica as lâminas foram preparadas adicionando gelatina glicerinada juntamente com a amostra para fixá-la. As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio ótico Olympus BX40 com câmera de captura Olympus DP71 acoplada no Laboratório de Ficologia da UFPR.

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada a preparação do material com base na metodologia descrita por RAMOS *et al.* (2017). Foi adicionado CTAB 1:1 na amostra, a qual foi deixada em repouso por 12 horas. Posteriormente foi adicionada Poli-L-lysinana lamínula, sobre a qual uma gota da amostra foi adicionada. Após essa etapa, foi realizada a desidratação da amostra até seu ponto crítico, utilizando etanol em concentrações variadas de 50 a 100 %. Após a desidratação, a lamínula foi colada em suporte de alumínio com fita de cobre e posteriormente foi metalizada com ouro em aparelho *Balzers Union* SCD 030. A amostra foi visualizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM6360 no centro de microscopia eletrônica da UFPR.

A identificação morfológica foi realizada por meio da análise de características como, morfologia do cenóbio, número de células, morfologia das células marginais, morfologia das células medianas, comprimento ( $\mu\text{m}$ ), largura ( $\mu\text{m}$ ) e presença ou ausência de cerdas e estrias longitudinais. Foi realizada a corrida da chave de características de acordo com a literatura pertinente, como Smith, (1916); Komárek, Ludvík, (1971); Comas, (1996); Oliveira, (2015); Nandi, Basu, Pal, (2017).

Importante ressaltar que a identificação morfológica foi realizada com o mesmo cultivo do qual foi retirada a alíquota para extração de DNA e identificação molecular, visando garantir a correta relação entre os achados morfológicos e moleculares. O cultivo foi realizado em meio de cultivo TAP (GORMAN, LEVINE, 1965) (QUADRO 2), por 7 dias em câmara de cultivo a 24 °C.

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO MEIO DE CULTIVO TAP

Solução de sais			
REAGENTE		SOLUÇÃO ESTOQUE	VOLUME PARA 1 L DE MEIO
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de Amônio	15 g.L <sup>-1</sup>	25 mL
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Magnésio heptahidratado	4 g.L <sup>-1</sup>	
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Cloreto de Cálcio dihidratado	2 g.L <sup>-1</sup>	
Solução de Fosfato			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Potássio dibásico	28,8 g · 100 mL <sup>-1</sup>	0, 375 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de Potássio monobásico	14,4 g · 100 mL <sup>-1</sup>	
Solução de metais			
Na <sub>2</sub> EDTA	EDTA dissódico	50 g · 250 mL <sup>-1</sup>	1 mL
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Zinco heptahidratado	22 g · 100 mL <sup>-1</sup>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Ácido Bórico	11,4 g · 200 mL <sup>-1</sup>	
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	Cloreto de Manganês tetrahidratado	5,06 g · 50 mL <sup>-1</sup>	
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Ferro heptahidratado	4,99 g · 50 mL <sup>-1</sup>	
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Cloreto de Cobalto hexahidratado	1,61 g · 50 mL <sup>-1</sup>	
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	Sulfato de cobre pentahidratado	1,57 g · 50 mL <sup>-1</sup>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MoO <sub>3</sub>	Molibdato de de Amônia tetrahidratado	1,1 g · 50 mL <sup>-1</sup>	
Complementos			
CH <sub>3</sub> COOH	Ácido Acético	***	1 mL
H <sub>2</sub> NC(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	Base Tris	2, 42 g.L -1	

FONTE: A autora (2020).

#### 4.2.2 Purificação e quantificação de DNA

Foi utilizado 5 mL do cultivo em fase estacionária, para a remoção do meio de cultura foi realizada a centrifugação da amostra e retirada do sobrenadante, com posterior liofilização da biomassa. Para a extração de DNA foi utilizado o protocolo de Raeder e Broda, (1985). Posteriormente foram realizadas análises eletroforéticas em gel de agarose 1,5 %, em tampão TAE 1X, utilizando o marcador de peso molecular *Invitrogen, 1Kb Plus DNA Ladder*

#### 4.2.3 Taxonomia molecular baseada no sequenciamento do DNA

Para a amplificação do DNA foram utilizados os *primers* ITS VG9 e LS266 (HOOG, GERRITS VAN DEN. ENDE, 1998) e o *Kit TopTaq Master Mix (Qiagen)*. A amplificação do DNA foi realizada em Termociclador *Bio-Rad* modelo T100™ *ThermalCycler*. As condições utilizadas foram 94° C por 3 minutos, 94° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos (temperatura de anelamento específica para cada par de *primers*, de acordo com o descrito na literatura), 72 ° C por 1 minuto, repetidos em 35 ciclos. A extensão final foi realizada a 72 ° C por 10 minutos (QUADRO 3).

QUADRO 3 - PRIMERS UTILIZADOS, SEQUÊNCIA 5' - 3', TEMPERATURA DE ANELAMENTO E REFERÊNCIAS.

Região	Primer	Sequência 5' - 3'	Temperatura Anelamento	Referências
<i>Internal transcribed spacer(ITS)</i>	VG9	TGCGTTGATTACGTCCCTGC	55°C	Hoog, Gerrits van den. Ende, 1998
	LS266	GCATTCCCAAACAACCTCGACTC	55°C	Masclauxet <i>al.</i> 1995

FONTE: A autora (2020).

O sequenciamento foi realizado com *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)* em sequenciador automático ABI3500

pelo método de Sanger. O alinhamento e análise das sequências foi realizado nos softwares *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* - MEGA 10.1 (<https://www.megasoftware.net/>) e *BioEdit* 7.1 (<https://bioedit.software.informer.com>). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e AlgaeBase ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)). A análise filogenética das sequências foi realizada pelo método de inferência Bayesiana no software *Mr Bayes* versão 3.2.7 (<http://nbisweden.github.io/MrBayes/>). Na análise filogenética foi utilizado o modelo evolutivo Kimura dois parâmetros. A árvore foi gerada com o software GARLI 2.01, através da plataforma CIPRES (<http://www.phylo.org/>).

#### 4.4 PRÉ-CULTIVO

O isolado foi cultivado em meio CHU, em câmara de cultivo a 25°C com luz contínua e aeração. Foi coletado 5 mL deste pré inoculo em triplicata para a quantificação da concentração do isolado no cultivo. Com esse resultado, foi definida a concentração inicial para realizar o experimento com variações na concentração de nutrientes (FIGURA 3).

#### 4.3 TESTES COM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

O experimento com o cultivo utilizando diferentes fontes de C, N e P foi realizado com uma concentração inicial de 0,01 g/L de biomassa obtida de pré-inóculo em meio CHU (QUADRO 4). Os isolados foram cultivados em erlenmeyer de 2 L com 1,5 L de meio de cultivo CHU alterado.

Foi adicionado ½ e 2x a concentração de N e P ao meio, além disso, foram adicionadas duas concentrações diferentes de glicerol (5g/L e 10g/L) como fonte de C ao meio, que tradicionalmente não tem nenhuma (QUADRO 5). Os isolados foram cultivados em câmara de incubação a 25 °C, com luz contínua (400 lux) e aeração.



QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO MEIO DE CULTIVO CHU PADRÃO E VARIAÇÕES UTILIZADAS

FONTE	COMPONENTE	MEIO PADRÃO	VARIAÇÕES (g/L)	
		MASSA (g/L)	1/2	2X
Nitrogênio (N)	Nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ )	0,25	0,12	0,5
Fósforo (P)	Fosfato de Potássio dibásico	0,075	0,0375	0,15
	Fosfato de Potássio monobásico	0,175	0,0875	0,35
Metais	Sulfato Ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,005	***	
	Cloreto de manganês ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	$1,44 \times 10^{-5}$	***	
	Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	$1,57 \times 10^{-5}$	***	
	Sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	$8,82 \times 10^{-5}$	***	
	Cloreto de cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	$4,9 \times 10^{-6}$	***	
	Molibdato de sódio	$7,1 \times 10^{-6}$	***	
Outros	EDTA ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,05	***	
	Hidróxido de Potássio (KOH)	0,031	***	
	Cloreto de Cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,025	***	
	Sulfato de Magnésio	0,075	***	
	Cloreto de Sódio (NaCl)	0,025	***	
	Ácido Bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0,01142	***	
Carbono	Glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ )	***	5	10

FONTE: A autora (2020).

FIGURA 3: PROCEDIMENTOS INICIAIS PARA O CULTIVO DO ISOLADO LGMM12 EM DIFERENTES FORMULAÇÕES DE CHU



Nota: Alíquota contendo 0,01 g/ L do pré-inóculo foi adicionada a cada um dos diferentes tratamentos.

FONTE: A autora (2020).

Para avaliação da cinética do crescimento nos diferentes tratamentos foi realizada análise de peso da biomassa seca em triplicata, a cada 3 dias até completar 16 dias. Ao final do período de cultivo foi avaliada a produção de lipídeos, carboidratos e pigmentos. Todos os controles foram realizados utilizando o meio de cultura CHU sem alterações, seguindo as mesmas condições de cultivo.

QUADRO5: TRATAMENTOS COM SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES DE CARBONO, NITROGÊNIO E FÓSFORO

TRATAMENTOS	[ ] NUTRIENTES		
	C	N	P
(Controle)	0	0	0
1	5 g/L	1/2	1/2
2	10 g/L	1/2	1/2
3	5 g/L	2x	1/2
4	5 g/L	1/2	2x
5	10 g/L	1/2	2x
6	5 g/L	2x	2x
7	0	0	1/2
8	0	0	2x
9	0	1/2	0
10	0	2x	0
11	5 g/L	0	0
12	10 g/L	0	0

LEGENDA:  5 g/L  10 g/L  1/2  2X  Sem alteração

Nota: No quadro 1/2 se refere à metade da concentração utilizada no meio padrão, 2x se refere ao dobro da concentração utilizada no meio padrão e 0 se refere à concentração normal dos nutrientes no meio Chu. Foram testadas duas concentrações de glicerol como fonte de carbono,

FONTE: A autora (2020).

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA SECA

A quantificação da biomassa seca foi realizada em triplicata pelo método gravimétrico. Foram utilizados microfiltros de fibra de vidro, do tipo GF1, com capacidade de retenção de 0,7 µm. Os filtros foram mantidos em estufa a 60° para remover toda umidade e posteriormente foram pesados em balança analítica. Após a pesagem dos filtros uma alíquota de 5 mL de cada amostra foi filtrada através de um sistema de vácuo. Posteriormente, os filtros com as amostras foram mantidos em

estufa a 60° novamente antes de serem pesados. Com os dados obtidos foi realizada a aplicação da seguinte equação:

$$BS = \left( \frac{m_1 - m_2}{V} \right)$$

Em que:

$BS$  = biomassa seca (g/L);

$m_1$  = massa do microfiltro vazio (g);

$m_2$  = massa do microfiltro com biomassa de microalga (g);

$V$  = alíquota filtrada (L).

#### 4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Para analisar os dados referentes à biomassa seca foi utilizada a média dos resultados das três repetições de cada amostra e o desvio padrão, calculado pela equação abaixo:

$$S = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{(n - 1)}$$

Em que:

$S$  = Desvio padrão;

$X_i$  = Valor individual das amostras;

$\bar{X}$  = Média dos valores das amostras;

$n$  = Número de amostras.

Com o auxílio do programa *Graph Pad Prism* 8.2.1 (<https://www.graphpad.com/>) a normalidade dos dados obtidos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Posteriormente foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

#### 4.7 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS

A quantificação de carboidratos foi realizada em triplicata para todos os tratamentos, de acordo com a metodologia descrita por Dubois *et al.* (1956), a qual utiliza fenol e ácido sulfúrico na extração.

Em 20 mg de biomassa seca liofilizada em frascos de vidro foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 80%. Os frascos com as amostras e o ácido foram mantidos em gelo por 4 horas, para evitar carbonização das amostras. Após esse período, o material foi retirado do gelo e deixado em temperatura ambiente por mais 16 horas.

Após esse período, as amostras foram diluídas em 9 mL de água destilada. Foi retirada uma alíquota de 1,5 mL em micro tubos *ependorf* e centrifugada a 8.000 G por 10 minutos. Após esse período, foram retirados 50  $\mu$ L do sobrenadante e colocados em tubos de ensaio, aos quais foram adicionados 500  $\mu$ L de solução de fenol 5% (m/v) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. As amostras foram imediatamente colocadas em espectrofotômetro a 490nm.

A curva padrão foi feita com uma solução de glicose em concentração de 1mg/mL, utilizando volumes de 10 a 50  $\mu$ L da solução. A curva padrão foi lida em quintuplicata. Após a leitura das amostras, foi aplicada a seguinte equação aos resultados:

$$\begin{array}{l}
 \text{Peso amostra seca} \text{ ----- } 10 \text{ mL} \\
 X \text{ ----- } 0,05 \text{ mL} \\
 \text{**}(X \text{ em } \mu\text{g}) \\
 \\
 X (\mu\text{L}) \text{ ----- } 500 \mu\text{L} \text{ ----- } 100 \% \\
 \text{Valor encontrado} \\
 \text{na equação da reta} \text{ ----- } y \% \\
 \text{**}(Solução de glicose (1 \text{ mg/ml}) \\
 \\
 50 \mu\text{g} \text{ ----- } 100 \% \\
 \text{Valor encontrado} \\
 \text{na equação da reta} \text{ ----- } x \%
 \end{array}$$

#### 4.8 QUANTIFICAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS

A extração de lipídeos totais foi realizada pela metodologia descrita por Bligh e Dyer (1959) de extração a frio, adaptada por Soares (2010). Em 50mg de biomassa seca das amostras em tubos de 15 mL, foram adicionados 3 mL de solução clorofórmio:metanol (2:1) e 10 µL de butil hidróxi tolueno (1% em metanol).

Após essa primeira etapa, as amostras foram submetidas a 3 ciclos de sonicação em banho de ultrasson (*Única Ultra Cleaner* 1400, frequência 40 kHz) por 15 minutos. Para facilitar a extração dos lipídeos, as amostras foram mantidas a 4° C, ao abrigo da luz, por 24 horas após a sonicação.

Completado esse período, as amostras foram novamente submetidas a 3 ciclos de sonicação por 15 minutos e posteriormente foram centrifugadas a 2.000 G por 5 minutos a 5° C. Para recuperar o sobrenadante composto pela fase lipídica, foi utilizado outro tubo de 15 mL.

Após 3 ciclos de centrifugações e lavagens com a solução de clorofórmio, as amostras recuperadas contendo clorofórmio e a porção lipídica foram mantidas em capela de exaustão, até a completa evaporação do clorofórmio. Após esse período a massa lipídica foi mensurada por meio da equação abaixo:

$$LT = m_f - m_0 \times \frac{100}{m_b}$$

Onde:

LT = lipídeos totais da amostra seca utilizada (%);

$m_0$  = massa do frasco de vidro vazio (g);

$m_f$  = massa do frasco de vidro contendo lipídeos (g);

$m_b$  = biomassa seca utilizada na extração de lipídeos.

#### 4.9 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS

A quantificação de pigmentos foi realizada de acordo com metodologia descrita por Lourenço (2006). Em 10 mg de biomassa seca das amostras em tubos de 15 mL foram adicionados 6 mL de etanol absoluto. Posteriormente as amostras foram aquecidas e mantidas a 60°C por 40 minutos e imediatamente resfriadas a 0°C por 15 minutos. O sobrenadante foi gentilmente recuperado por inversão dos tubos. Para melhor extração, o procedimento foi realizado duas vezes.

Após a extração, a absorbância dos sobrenadantes foi medida em espectrofotômetro nos comprimentos de 665 nm, 649 nm e 470 nm. As concentrações de clorofila e carotenóides foram quantificadas pelas seguintes equações:

$$Clorofila_a = (13,95.A_{665} - 6,88.A_{649}).fator\ de\ diluição\ (mg\ L^{-1})$$

$$Clorofila_b = (24,96.A_{649} - 7,32.A_{665}).fator\ de\ diluição\ (mg\ L^{-1})$$

$$Clorofila_{tot} = Clorofila_a + Clorofila_b\ (mg\ L^{-1})$$

$$Carotenóides_{tot}$$

$$= \frac{fator\ de\ diluição.1000.A_{470} - 2.05.Clorofila_a - 114,8.Clorofila_b}{245} (mg\ L^{-1})$$

## 5. RESULTADOS

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Para a identificação morfológica do isolado LGMM12 foi criada uma tabela com a descrição das características morfológicas de todas as espécies de *Tetrademus* descritas pelo *Algae Base* (ANEXOS 1 e 2). Os principais caracteres observados foram selecionados com base na literatura clássica de identificação morfológica (FOOT, KOMAREK, 1974) e em trabalho de levantamento florístico e identificação realizada no Brasil (GODINHO, 2009).

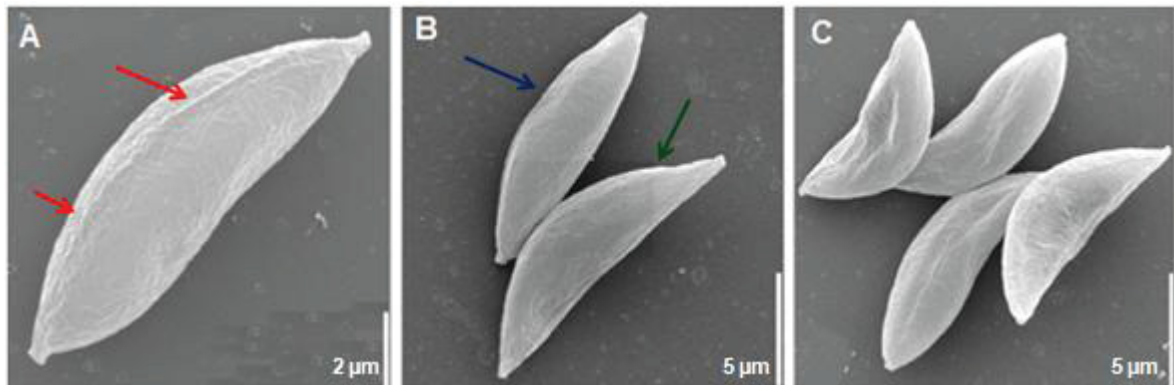
As características observadas são as principais utilizadas para identificação taxonômica de Scenedesmaceae, sendo eles: forma da célula; tamanho do cenóbio e das células (comprimento e largura máximos); ausência ou presença de “decoração” na parede celular (espinhos, protrusões e estrias).

Pela análise morfológica foi possível identificar o isolado LGMM12 como pertencente ao gênero *Tetrademus*, devido principalmente ao seu formato fusiforme e a formação de cenóbios. A análise mais aprofundada de características como formato e disposição das células que compõe o cenóbio permitiu identificar sua proximidade morfológica com as espécies *T.bernardii*, *T.dimorphus*, *T.incrassatulus* e a espécie utilizada pelo grupo de pesquisa do NPDEAS *T.obliquus* (QUADRO 6).

A principal característica que difere o isolado LGMM12 da espécie *T.obliquus* é a presença de estria longitudinal nas células e o padrão alternado de fixação das células no cenóbio (FIGURA 4-C), enquanto *T. obliquus* apresenta um padrão linear e ausência de estria na parede celular (FIGURA 4-A). Além disso, não foram observados cenóbios com mais de 4 células nas condições de cultivo utilizadas para LGMM12. Assim como, suas células mantêm formato fusiforme, com variações semi-lunadas nas células medianas (FIGURA 4-B).



FIGURA 4- IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO ISOLADO LGMM12 APÓS 7 DIAS DE CULTIVO A 24°C, EM MEIO TAP LGMM12



Nota: Obtida em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM6360.

Legenda: Figura A mostra uma célula isolada de LGMM12, as flechas indicam a estria longitudinal. Figura B, flecha azul mostra célula com formato fusiforme e flecha verde mostra célula com formato semi-lunado. Figura C mostra padrão alternado de disposição das células no cenóbio.

FONTE: A autora (2020).

QUADRO 6-COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO ISOLADO LGMM12 E DE ESPÉCIES PRÓXIMAS.

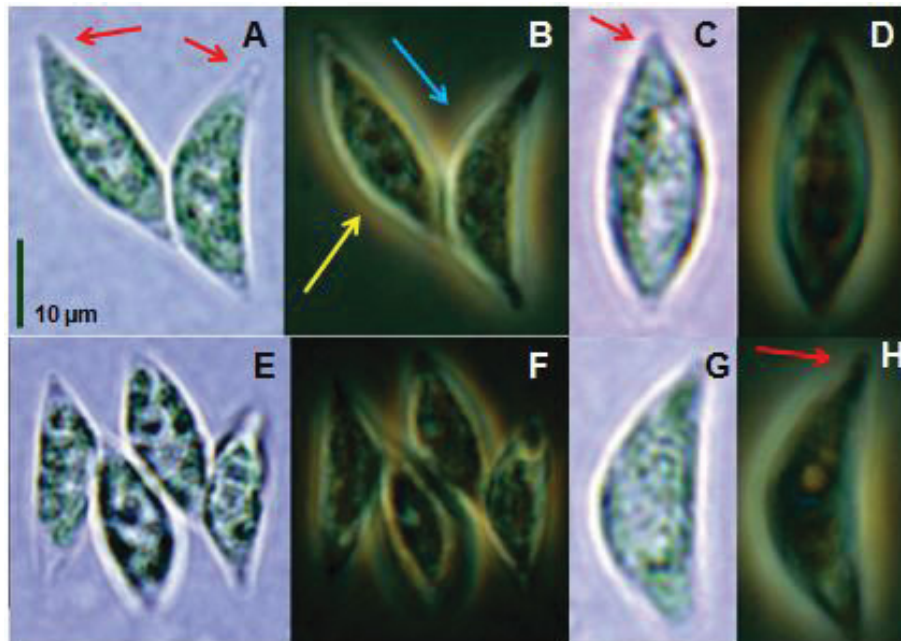
Espécies	<b>LGMM12</b>	<i>T. bernardii</i>	<i>T. dimorphus</i>	<i>T. incrassatulus</i>	<i>T. obliquus</i>	<i>T. wisconsinensis</i>
Cenóbio	<b>Alternado</b>	Linear ou alternado	Linear ou alternado	Linear ou alternado	<b>Linear</b> ou alternado	Linear
Nº Células cenóbio	<b>2;4</b>	2;4;8	2;4;8	2;4;8	2;4; <b>8</b>	2;4
Célula Marginal	<b>Fusiforme</b>	Fusiforme ou lunada	Fusiforme, Elipsóide, lunada ou semi-lunada	Fusiforme semi-lunada ou lunada	Fusiforme, <b>Elipsóide</b> , lunada ou semi-lunada	Fusiforme, Elipsóide, lunada ou semi-lunada
Célula Mediana	<b>Fusiforme ou semi-lunada</b>	Fusiforme ou lunada	Fusiforme, Elipsóide ou elíptica	Fusiforme semi-lunada ou lunada	Fusiforme, <b>Elipsóide</b>	Fusiforme, Elipsóide, lunada ou semi-lunada
Célula Isolada	<b>Fusiforme ou semi-lunada</b>	Ausente	Ausente	Fusiforme semi-lunada ou lunada	Ausente	Ausente
Ápices	<b>Cuneado</b>	Cuneado ou Pontagudo	Cuneado ou Pontagudo	Pontagudo	<b>Arredondado</b> cuneado ou Pontagudo	Cuneado ou Pontagudo
Estria Longitudinal	<b>Presente</b>	Ausente	Presente	Ausente	<b>Ausente</b>	Ausente
Protrusões no ápice	<b>Ausente</b>	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
Referência Descrição	<b>***</b>	Smith, 1916	Turpin, 1828	Bohlin, 1897	Turpin, 1828	Smith, 1913

Nota: Destacados em verde o isolado LGMM12 e *T. obliquus*. Em vermelho, características morfológicas que os diferem. Destacada em azul a espécie tipo do gênero *Tetradismus*.

FONTE: A autora (2020).

O ápice das células do isolado LGMM12 mantém um padrão cuneado (FIGURA 5-A,C,H). Não foram observadas células com ápices arredondados ou células com formato elipsóide (FIGURA 5-B).

FIGURA 5-IMAGENS DE MICROSCOPIA ÓTICA DO ISOLADO LGMM12 APÓS 7 DIAS DE CULTIVO A 24°C, EM MEIO TAP.



Legenda: Figura A,C e H, flechas vermelhas sinalizando os ápices com padrão de formato cuneado das células. Figura B, flecha amarela indicando célula em formato fusiforme e flecha azul incidando célula em formato semi-lunado.

FONTE: A autora (2020).

Como apontado por Johnson *et al.* (2007) as microalgas apresentam grande plasticidade fenotípica, assim como ampla distribuição pelo mundo inteiro, podendo apresentar alterações em sua morfologia dependendo da região onde são coletadas, e das condições de cultivo em laboratório.

## 5.2 TAXONOMIA MOLECULAR

A análise comparativa das características morfológicas observadas no isolado LGMM12 com as espécies atualmente aceitas para o gênero *Tetrademus* indicam

que o isolado é uma espécie nova do gênero, o que pode ser embasado pela análise molecular.

Krienitz *et al.* (2003) abordam que as inúmeras mudanças de gênero ou táxons que ocorreram dentro da família Scenedesmaceae, tornaram a identificação destes organismos mais desafiadora, pois muitas vezes os dados moleculares e morfológicos não contam a mesma história evolutiva, evidenciando a necessidade de mais trabalhos de identificação unindo abordagens moleculares e morfológicas.

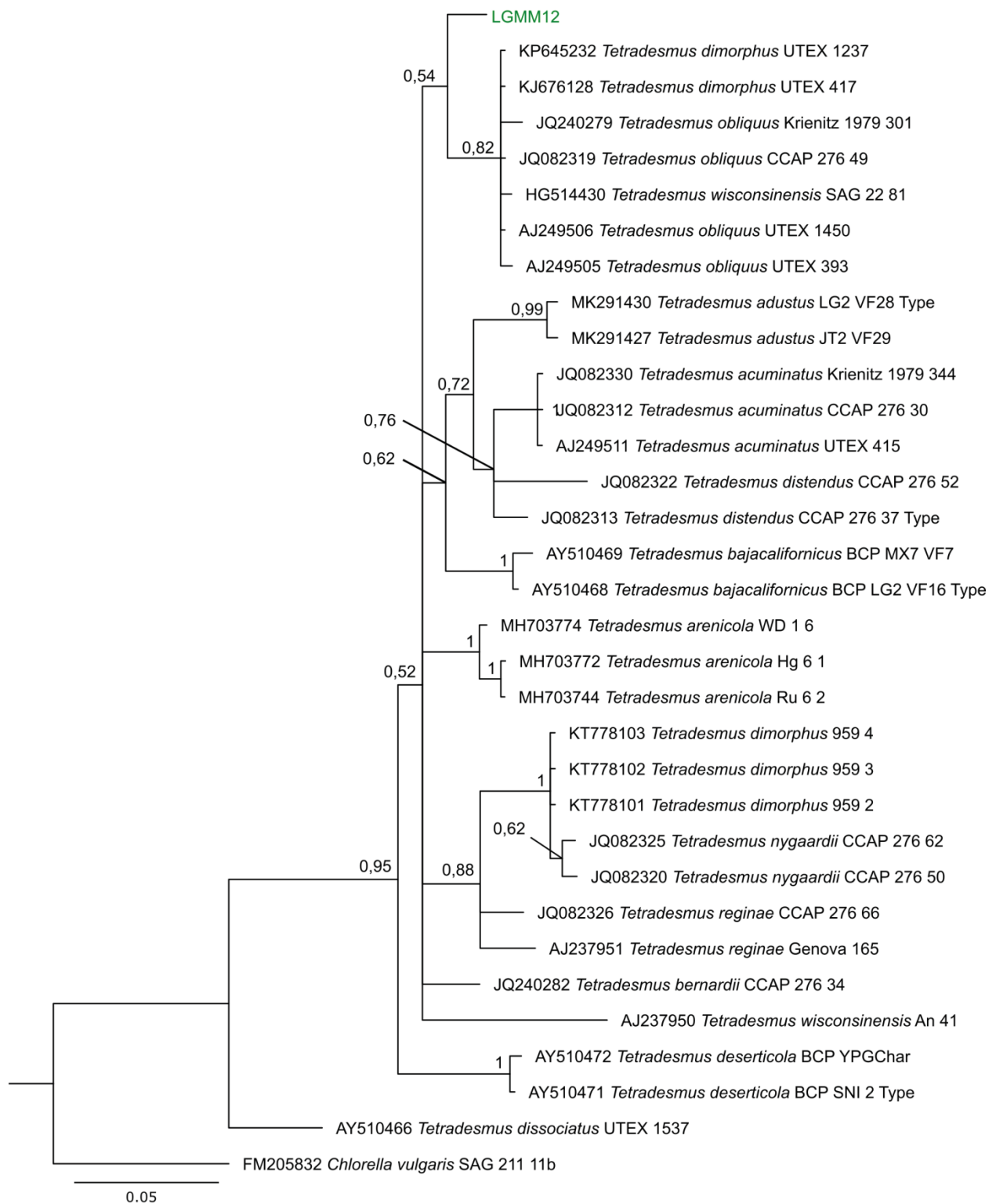
Das 26 espécies de *Tetradesmus* citadas no banco de dados Algae base, 9 não possuem sequências genéticas disponíveis, desta maneira, foi realizada apenas a análise morfológica comparativa com o isolado LGMM12.

Para as análises filogenéticas foi realizado um levantamento das principais e mais confiáveis sequências genéticas disponíveis no Genbank, partindo de bancos de dados para o gênero *Tetradesmus*. Foram selecionadas principalmente sequências utilizadas em artigos de identificação (Hegewald, Bock, Krienitz, 2013; Lewis, Flechtner, 2004; Hall, Fucikova, Lo, Lewis, Karol, 2010; Terlova, Lewis, 2019)(QUADRO 7), com cepas identificadas provenientes de coleções como *Culture Collection of Algae and Protozoa* (CCAP), *Culture Collection of Algae* (SAG), *Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin* (UTEX). A seleção de sequências foi realizada apenas para as regiões ITS-1 e ITS-2.

Para gerar a árvore filogenética, o melhor modelo indicado pelo software MEGA foi Kimura 2 parâmetros. A árvore filogenética gerada por inferência Bayesiana mostra o isolado LGMM12 em um ramo isolado das outras espécies, corroborando a análise morfológica e fornecendo maior suporte para a hipótese de o isolado ser uma nova espécie (FIGURA 6).

Ao realizar uma investigação mais atenta da árvore gerada, é possível perceber que as cepas identificadas como *T. dimorphus* (UTEX 1237), *T. dimorphus* (UTEX 417), *T. incrassatulus* (CCAP 276 43) e *T. wisconsinensis* (SAG 22 81) ficaram no mesmo ramo que *T. obliquus* (FIGURA 7). Todas as cepas são provenientes de coleções reconhecidas, todavia nas coleções, as cepas em questão estão identificadas como *Tetradesmus obliquus* ou a tem como sinônimo. Desta maneira, pode-se considerar que as cepas dessas espécies alinhadas com *T. obliquus*, realmente pertencem a essa espécie, porém a identificação delas no Genbank está equivocada.

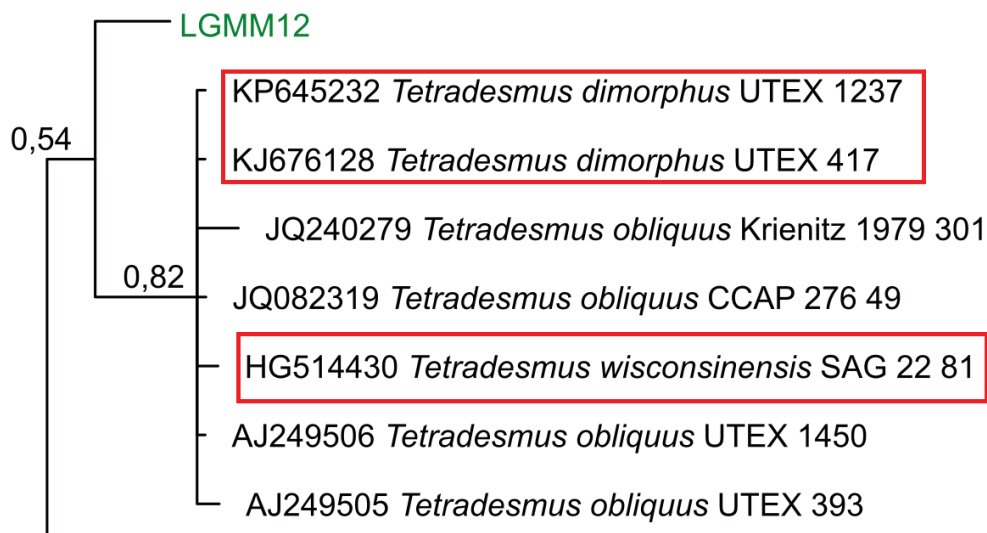
FIGURA 6-ÁRVORE FILOGENÉTICA GERADA POR INFERÊNCIA BAYESIANA PARA SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS DE *Tetrademus* spp



Legenda: Destacado em verde o isolado LGMM12 em ramo isolado das demais espécies. *Outgroup* utilizado: *Chlorella vulgaris*, sequência tipo SAG 211-11 b (AY591508).

FONTE: A autora (2020).

FIGURA 7: DESTAQUE DAS SEQUÊNCIAS IDENTIFICADAS EQUIVOCADAMENTE NOS BANCOS DE DADOS, QUE ALINHAM COM A ESPÉCIE *T. obliquus*.



FONTE: A autora (2020).

As falhas de correspondência entre sequências de *T. dimorphus*, *T. incrassatulus* e *T. wisconsinensis* disponíveis no banco de dados Genbank e as cepas depositadas nas coleções, as quais estavam identificadas como *T. obliquus*, embora não tenham afetado nosso resultado final, podem ser geradoras de confusão na identificação futura de novas espécies. Evidenciando a necessidade de maior curadoria no momento de submissão das sequências e das cepas dos isolados nos bancos de dados disponíveis para microalgas. Apesar das incongruências encontradas, as espécies *T. dimorphus* e *T. wisconsinensis* possuem outras sequências disponíveis, pelas quais geraram ramos isolados na árvore filogenética, mostrando que o isolado LGMM12 não pertence a essas espécies.

Terlova, Lewis (2019) concluem sobre a necessidade de mais pesquisas voltadas para a identificação molecular de organismos do gênero *Tetradesmus*, abordando que a morfologia simplificada de grande parte das espécies de Scenedesmaceae torna a identificação por meio dos dados de DNA mais confiável. Desta maneira, as análises realizadas com abordagem molecular e morfológica tornam os resultados encontrados neste trabalho mais robustos.

QUADRO 7: ESPÉCIES DE *Tetrademus* COM SEQUÊNCIA DA REGIÃO ITS DISPONÍVEIS NO BANCO DE DADOS GENBANK

ESPÉCIE	CEPA	REFERÊNCIA	ITS 1	5.8S	ITS 2
<i>Tetradesmus adustus</i>	JT2-VF28 T**	Terlova, Lewis, 2019	***	MK291430	
	JT2-VF29		***	MK291427	
<i>Tetradesmus acuminatus</i>	Krienitz 1979-344	Hegewald, Bock, Krienitz,L. 2013	JQ082330		
	CCAP 276/30	Hegewald, Bock, Krienitz,L. 2013	JQ082312		
	UTEX 415	Hegewald, Bock, Krienitz,L. 2013	AJ249511		
<i>Tetradesmus arenicola</i>	Ru-6-2	Mikhailyuk et al., 2019	MH703744		
	WD-1-6	Mikhailyuk et al., 2019	MH703774		
	Hg-6-1	Mikhailyuk et al., 2019	MH703772		
<i>Tetradesmus bajacalifornicus</i>	BCP-LG2VF16 T**	Hall, Fucikova,Lo, Lewis, Karol, 2010	AY510468		
	BCP-MX7-VF7	Hegewald, Bock, Krienitz,L. 2013	AY510469		
<i>Tetradesmus bernardii</i>	CCAP 276/34	Hegewald, Bock, Krienitz,L. 2013	***	JQ240282	
<i>Tetradesmus deserticola</i>	BCP-YPG-Cha	Lewis, Flechtner, 2004	AY510472		
	BCP-SNI-2 T**	Lewis, Flechtner, 2004	AY510471		
<i>Tetradesmus dimorphus</i>	959_4	Zou <i>et al.</i> 2016	KT778103		
	959_3	Zou <i>et al.</i> 2016	KT778102		
	959_2	Zou <i>et al.</i> 2016	KT778101		
	UTEX417	Rosenberg et al. 2014	KJ676128		
	UTEX 1237	Bohutskyi et al. 2015	KP645232		
<i>Tetradesmus dissociatus</i>	UTEX 1537	Lewis, Flechtner, 2004	AY510466		
<i>Tetradesmus distendus</i>	CCAP 276/37 T**	Hegewald, Bock, Krienitz,L. 2013	JQ082313		
	CCAP 276/52	Hegewald, Bock, Krienitz,L. 2013	JQ082322		
<i>Tetradesmus incrassatulus</i>	CCAP:276/43	Toledo-Cervantes et al. 2018	KP318982		
<i>Tetradesmus nygaardii</i>	CCAP 276/50	Hegewald, Bock, Krienitz,L. 2013	JQ082320		
	CCAP 276/62	Hegewald, Bock, Krienitz,L. 2013	JQ082325		
<i>Tetradesmus obliquus</i>	CCAP 276/49	Hegewald, Bock, Krienitz,L. 2013	JQ082319		
	Krienitz 1979/301	Hegewald, Bock, Krienitz,L. 2013	***	JQ240279	
	UTEX 393	van Hannen, Fink, Luerling Unpublished	AJ249505		
	UTEX 1450	van Hannen, Fink, Luerling Unpublished	AJ249506		
<i>Tetradesmus reginae</i>	CCAP 276/66	Hegewald, Bock, Krienitz,L. 2013	JQ082326		
	Genova 165	An, Friedl, Hegewald, 2003	***	AJ237951	
<i>Tetradesmus wisconsinensis</i>	An 41	An, Friedl, Hegewald, 2003		AJ237950	
<i>Tetradesmus wisconsinensis</i>	SAG 22.81	Sciuto et al. 2015	HG514430		

OUTGROUP	CEPA	REFERÊNCIA	ITS 1	5.8S	ITS 2
<i>Chlorella vulgaris</i>	SAG 211-11 b T**	Luo et al., 2010	AY591508		

Nota: T\*\* = Sequência tipo da espécie; \*\*\* Sequência não contém a região ITS 1

FONTE: A autora (2020)



### 5.3 QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

No experimento delineado utilizando diferentes concentrações de nutrientes para o cultivo do isolado LGMM12 todos os tratamentos foram iniciados com uma concentração de 0,01 g/L de biomassa. Foi observada maior produtividade diária de biomassa no tratamento 4 (5g/L de glicerol, metade da concentração padrão de P e o dobro da concentração padrão de N) com produtividade diária de 0,09 g/L de biomassa (QUADRO 8) e no tratamento 6, com cerca de 0,10 g/L (5g/L de glicerol, e o dobro das concentrações padrões de N e P) (FIGURA 8).

QUADRO 8: PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA (g/L) POR *Tetrademus* LGMM12 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES EM MEIO CHU

Tratamentos				Produção de biomassa g/L <sup>-1</sup>					Produtividade g/L <sup>-1</sup> dia <sup>-1</sup>
[ ] Nutrientes			Identificação	3 dias	6 dias	9 dias	12 dias	16 dias	
C (g/L)	N	P							
0	0	0	(Controle)	0,10	0,24	0,39	0,53	0,70	0,05
5	1/2	1/2	1	0,14	0,32	0,49	0,68	0,82	0,06
10	1/2	1/2	2	0,05	0,20	0,41	0,59	0,60	0,05
5	1/2	2x	3	0,08	0,18	0,34	0,57	0,75	0,06
5	2x	1/2	4	0,10	0,71	0,71	0,93	1,22	0,09
10	2x	1/2	5	0,07	0,22	0,33	0,47	0,79	0,06
5	2x	2x	6	0,12	0,21	0,37	1,20	1,37	0,10
0	1/2	0	7	0,09	0,27	0,29	0,44	0,56	0,04
0	2x	0	8	0,10	0,24	0,31	0,48	0,54	0,04
0	0	1/2	9	0,09	0,28	0,35	0,57	0,70	0,05
0	0	2x	10	0,09	0,24	0,32	0,42	0,52	0,04
5	0	0	11	0,06	0,27	0,47	0,68	0,94	0,07
10	0	0	12	0,16	0,34	0,56	0,84	0,90	0,06

Legenda: Destacados em verde, os tratamentos 4 e 6 que apresentaram maior produtividade diária de biomassa e maior quantidade total de biomassa observada após 16 dias de cultivo de LGMM12. Valores se referem a média das triplicatas analisadas em cada tratamento.

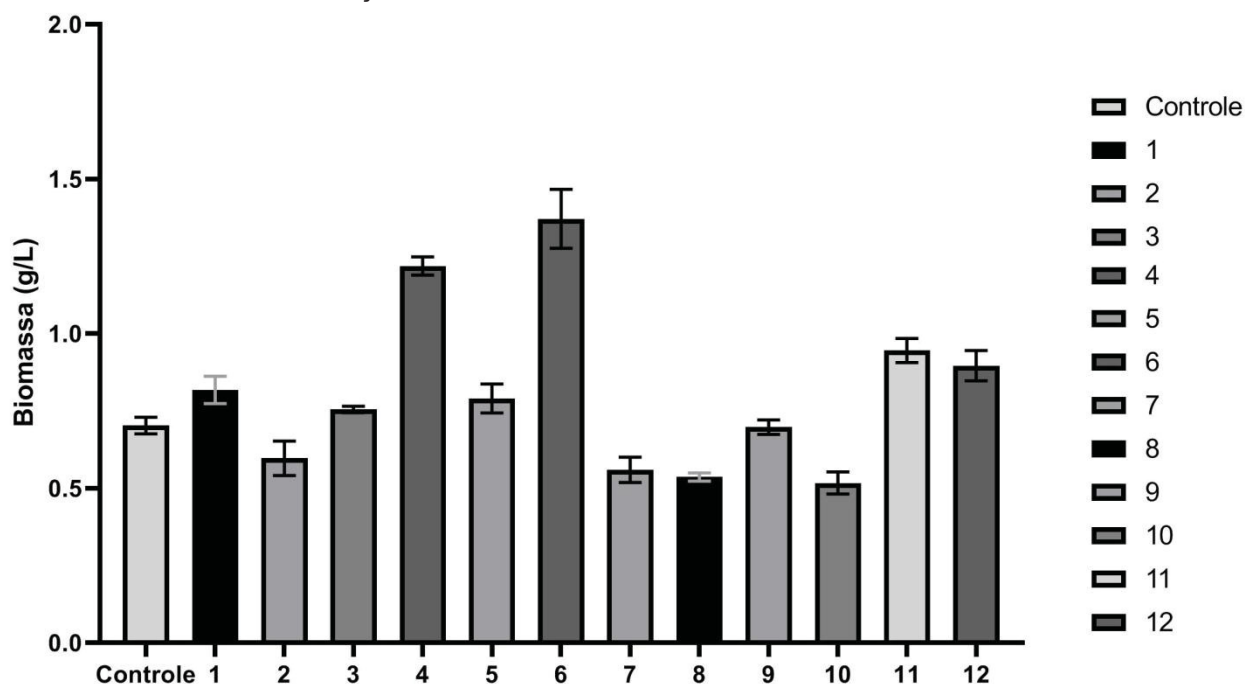
FONTE: A autora, (2020).

Foi observado que a adição de glicerol em uma concentração de 5 g/L como fonte de carbono no meio de cultivo teve efeito positivo na produtividade de biomassa pelo isolado LGMM12, os tratamentos 4, 6 ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle) apresentaram o dobro de produtividade de biomassa. Resultado semelhante foi observado por Gao *et al.* (2019) para a microalga da espécie



*Tetrademus bernardii* em cultivo mixotrófico utilizando glicerol como fonte de carbono. Os autores observaram maior produção de biomassa, chegando a cerca de 10 g/L, após 21 dias de cultivo em meio contendo glicerol.

FIGURA 8: PRODUÇÃO DE BIOMASSA PARA OS TRATAMENTOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE C, N e P APÓS 16 DIAS DE CULTIVO DE LGMM12.



FONTE: A autora, (2020).

Como explorado por Di Caprio *et al.* (2019) o cultivo heterotrófico de microalgas aumenta significativamente contaminações, principalmente por bactérias, em taxas de crescimento superiores em relação às microalgas.

Apesar dos cuidados com esterilização dos materiais de cultivo, assim como do meio de cultura e utilização de um pré-inóculo purificado, não foi possível impedir o desenvolvimento de contaminações em 2 tratamentos do experimento. Como abordado por Di Caprio *et al.* (2019), os desafios encontrados no cultivo mixotrófico de microalgas poderia trazer problemas a sua aplicabilidade em escala industrial considerando os altos custos para esterilização do cultivo.

## 5.4 QUANTIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foi avaliado o potencial do isolado para a produção de carboidratos, lipídeos e para os pigmentos clorofila e carotenóides (QUADRO 9). O isolado apresentou potencial para a produção de lipídeos, clorofila e carboidratos, sendo este último o que apresentou as maiores porcentagens na biomassa seca do isolado LGMM12.

QUADRO 9: COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA SECA DO ISOLADO LGMM12 APÓS 16 DIAS DE CULTIVO EM MEIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES.

Tratamentos				Bioprodutos %					Biomassa
[ ] Nutrientes			Identificação	Lipídeos	Clorofila	Carotenóides	Carboidratos	Proteínas + outros	seca g/L <sup>-1</sup>
C (g/L)	N	P							
0	0	0	Controle	16,92	1,55	0,29	44,93	36,31	0,70
5	1/2	1/2	1	19,87	0,32	0,15	19,43	60,23	0,82
10	1/2	1/2	2	26,66	0,39	0,18	31,07	41,69	0,60
5	1/2	2x	3	16,28	0,70	0,23	36,34	46,45	0,75
5	2x	1/2	4	12,43	0,66	0,18	33,99	52,74	1,22
10	2x	1/2	5	19,46	1,43	0,24	33,61	45,26	0,79
5	2x	2x	6	12,91	0,52	0,14	38,31	48,12	1,37
0	1/2	0	7	15,93	0,82	0,24	37,68	45,33	0,56
0	2x	0	8	16,57	2,83	0,26	23,30	57,04	0,54
0	0	1/2	9	14,59	0,56	0,18	49,69	34,98	0,70
0	0	2x	10	11,72	1,90	0,28	8,48	77,62	0,52
5	0	0	11	16,65	0,93	0,20	54,11	28,11	0,94
10	0	0	12	15,56	0,72	0,22	50,55	32,95	0,90

Legenda: Destacados em vermelho os melhores resultados ( $p < 0,05$ ).

FONTE: A autora (2020).

Dos 12 tratamentos analisados, os tratamentos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9 apresentaram taxas de carboidratos acima de 30% na biomassa seca do isolado, além do controle, que apresentou taxa superior a 40% e os tratamentos 11 e 12 com taxas superiores a 50% (FIGURA 9).

### 5.4.1 Carboidratos

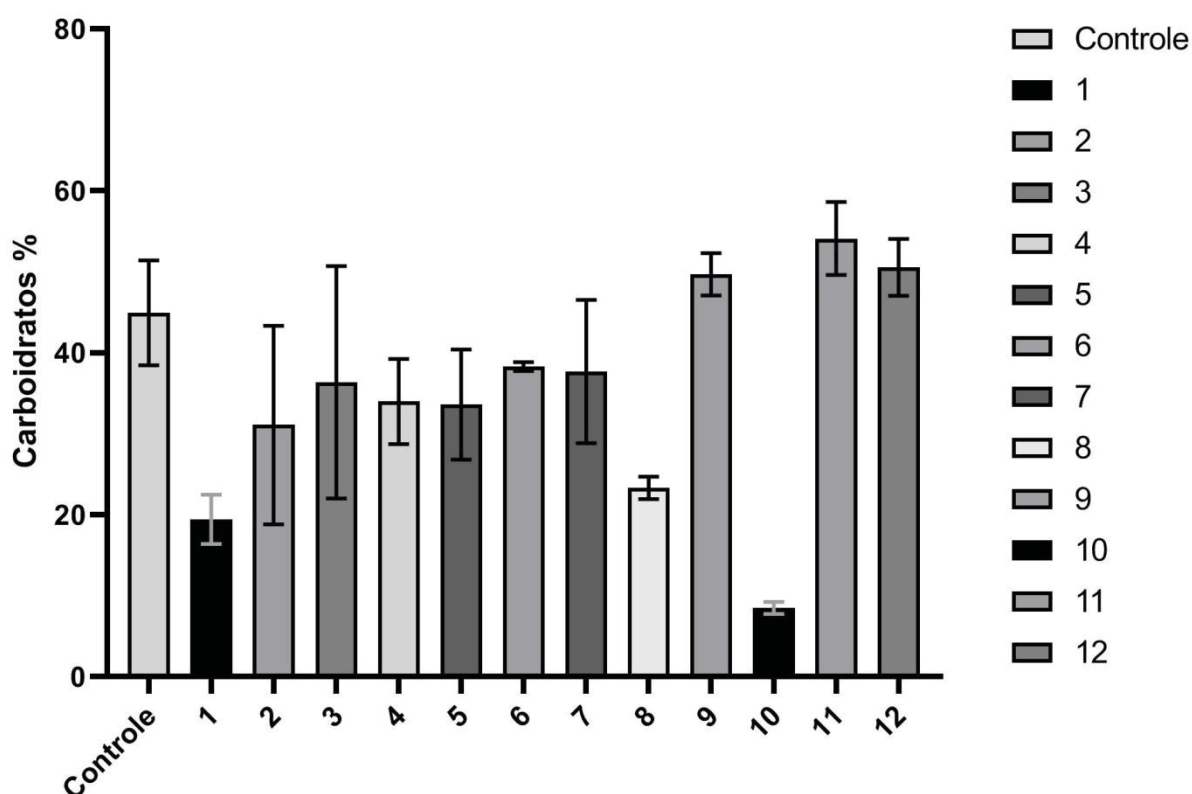
Os tratamentos que apresentaram maior porcentagem de sua biomassa convertida em carboidratos foram os tratamentos 9 (ausência de glicerol e concentração normal de N e 1/2 da concentração de P) com 49,69 %, tratamento 11

(5 g/L de glicerol e concentrações normais de N e P) com 54,11% e tratamento 12 (10 g/L de glicerol e concentrações normais de N e P) com 50,55 % (FIGURA 9).

É possível inferir que a alteração nas concentrações de nitrogênio não foi um fator potencializador para a produção de carboidratos pelo isolado LGMM12, diferentemente do encontrado por Ho, Shang (2012), que observaram uma produção de carboidratos de 46 % para a microalga *T. obliquus* cultivada em ausência de nitrogênio.

A depleção de fósforo teve efeito positivo para a produção desta macromolécula no tratamento 9, em que essa foi a única alteração do meio. Resultado semelhante foi observado por Gao *et. al* (2018) para a microalga *T. bernardii* cultivada em redução de fósforo, recuperando cerca de 44% de carboidratos.

FIGURA9: CARBOIDRATOS (%) RECUPERADOS NA BIOMASSA SECA APÓS 16 DIAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS UTILIZADOS NO CULTIVO DE LGMM12.



FONTE:A autora (2020).

Quando observado os resultados em que apenas glicerol foi adicionado ao meio (tratamentos 11 e 12), foram obtidas as maiores taxas de produção de carboidratos, 54,11% e 50,55% respectivamente. Valores semelhantes foram

observados por Patnaik, Mallick (2015) para a microalga *T.obliquus* quando cultivada em meio contendo uma combinação de acetato e citrato, chegando a cerca de 55% carboidratos e 44% quando cultivada em meio contendo apenas citrato como suplemento.

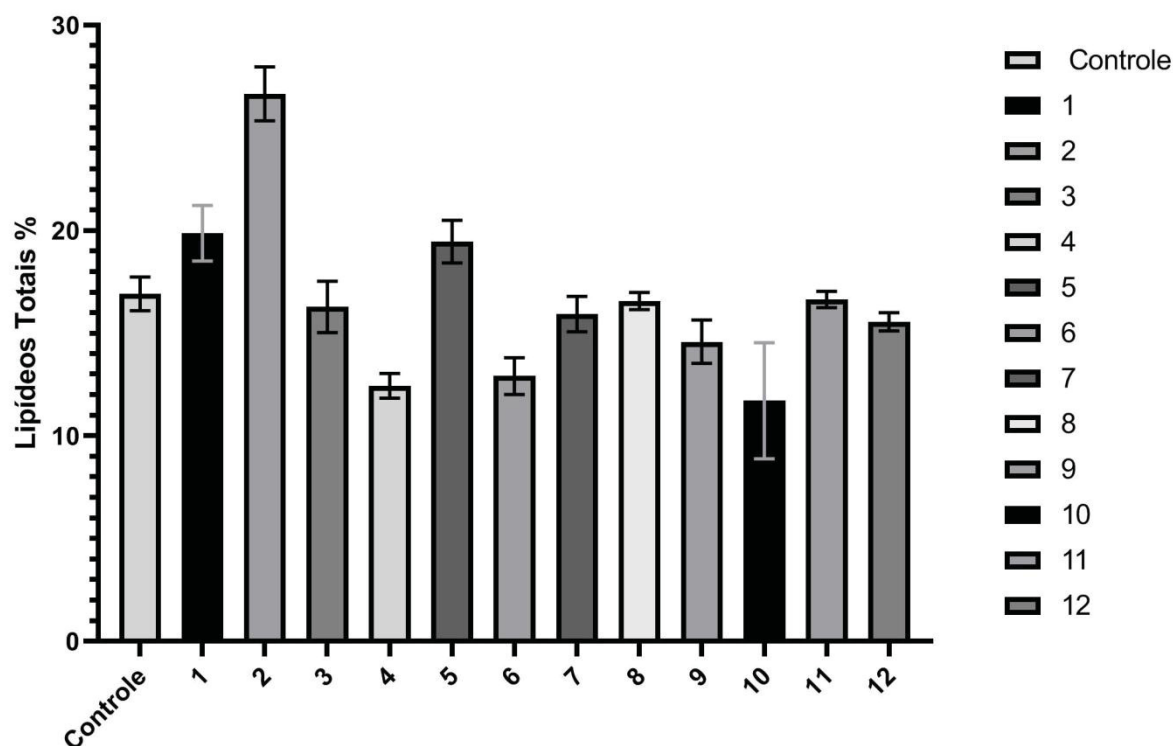
#### 5.4.2 Lipídeos

A melhor produção de Lipídeos foi observada para o tratamento 2 composto por 10 g/L de glicerol e metade das concentrações normais de N e P ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 10). Sabe-se que a ausência ou pouca disponibilidade de nutrientes como fósforo e nitrogênio tendem a levar ao acúmulo de lipídeos nas células dos isolados (CONVERTI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2010).

Nossos resultados estão de acordo com o observado na literatura (Ren *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2018) em que microalgas do gênero *Tetradismus* apresentaram maiores taxas de produção de lipídeos quando cultivadas em estresse pela ausência ou diminuição nas concentrações de fósforo e principalmente nitrogênio.

A adição de uma fonte de carbono ao meio juntamente com a limitação de nitrogênio e fósforo parece ter um efeito positivo na produtividade de lipídeos pelo isolado LGMM12 quando comparado aos demais tratamentos e controles. Esse resultado comprova a relação entre carbono, nitrogênio e fósforo em sistemas biológicos (FIELDS *et al.*, 2018), assim como, fortalece o efeito positivo que a privação de macronutrientes tem sobre o acúmulo de lipídeos em diferentes espécies de microalgas (FENG *et al.*, 2012; LIANG *et al.*, 2012; REN *et al.*, 2013; GAO *et al.*, 2018).

FIGURA10: LIPÍDEOS (%) RECUPERADOS NA BIOMASSA SECA APÓS 16 DIAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS UTILIZADOS NO CULTIVO DE LGMM12.

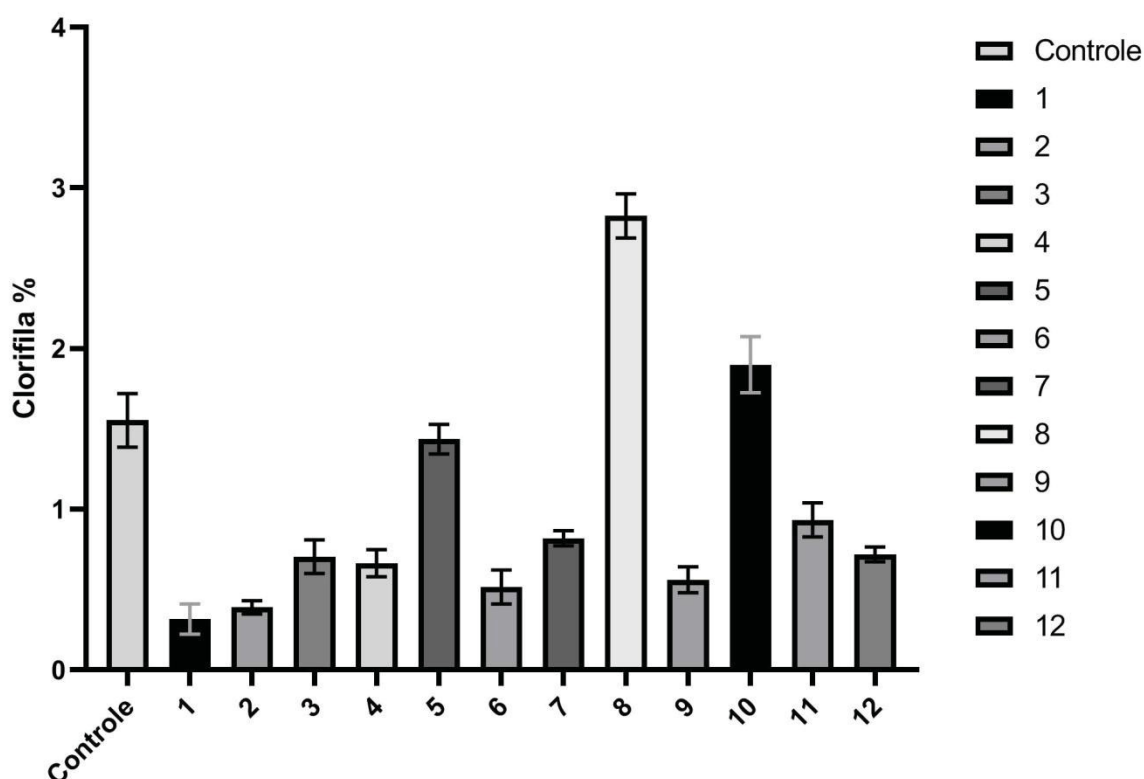


FONTE: A autora (2020).

#### 5.4.3 Pigmentos

Na quantificação de pigmentos, o melhor resultado foi observado para o tratamento 8 ( $p>0,05$ ) composto pelo dobro da concentração padrão de nitrogênio, concentração normal de fósforo e ausência de glicerol, no qual foi recuperado 2,83% de clorofila na biomassa seca do isolado. O tratamento 10, composto pelo dobro da concentração de padrão de fósforo, concentração normal de nitrogênio e ausência de glicerol também apresentou uma taxa significativa de clorofila se comparado aos outros isolados, nele foi recuperado 1,90% de clorofila na biomassa seca. O controle e o tratamento 5 (10 g/L de glicerol, o dobro da concentração normal de nitrogênio e metade da concentração padrão de fósforo) não apresentaram diferenças significativas entre eles, porém apresentaram diferença quando comparados aos outros tratamentos, no controle e tratamento 5 foram recuperados 1,55% e 1,43% de clorofila na biomassa seca, respectivamente (FIGURA11).

FIGURA11: CLOROFILA TOTAL (%) RECUPERADA NA BIOMASSA SECA APÓS 16 DIAS NOS DIFERENTES TRATAMENTOS UTILIZADOS NO CULTIVO DE LGMM12.



FONTE: A autora (2020).

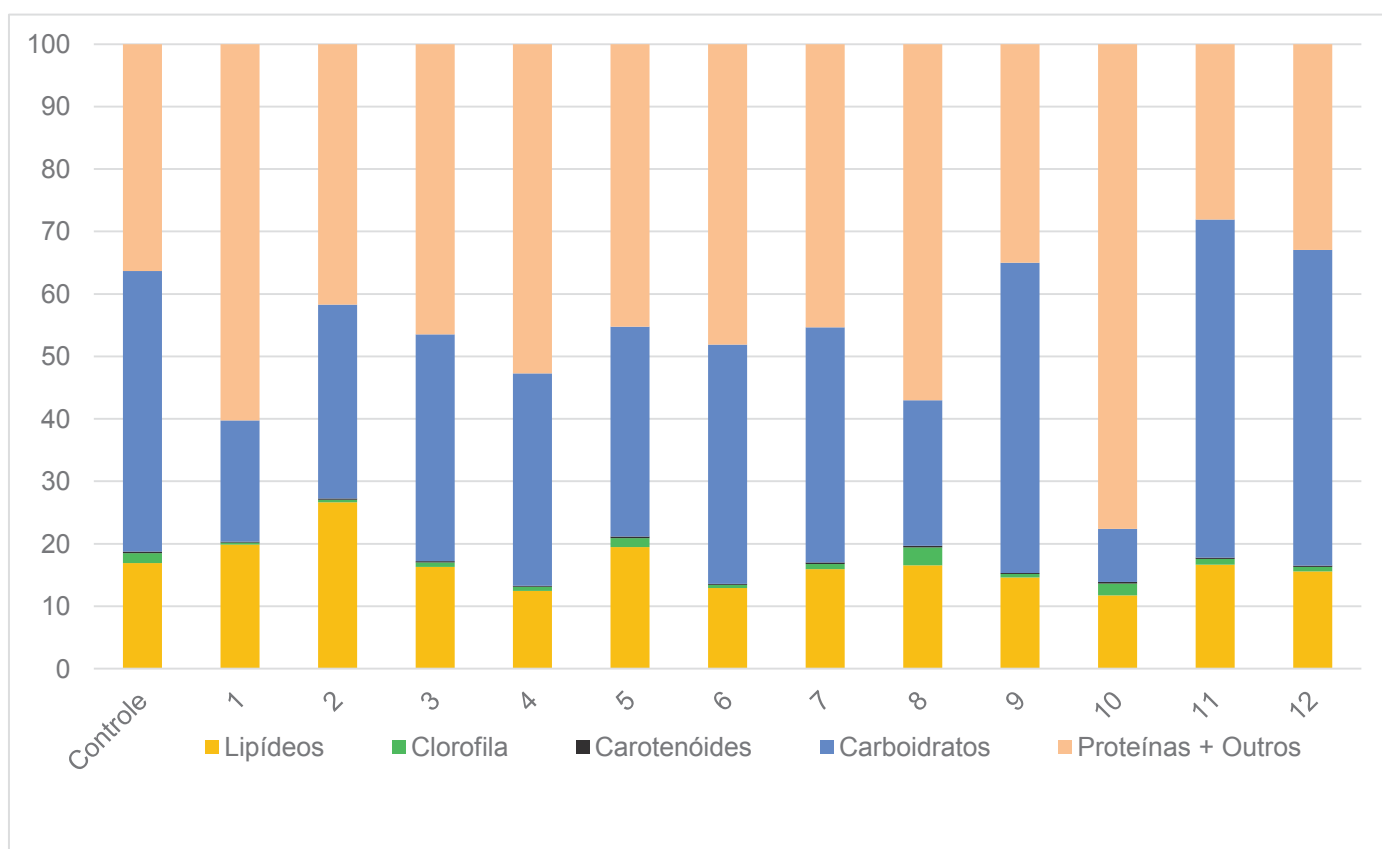
A porcentagem de clorofila observada na biomassa seca do isolado LGMM12 é bastante significativa, considerando que o valor está bastante próximo ao observado para espécies já utilizadas na indústria farmacêutica e alimentícia para a produção desse tipo de pigmento, como a cianobactéria *Aphanizomenon* que produz cerca de 1-2% de clorofila em sua biomassa seca (PULZ, GROSS, 2004) e a microalga *Spirulina* que produz cerca de 1-1,5 % de clorofila em sua biomassa seca (HARUN *et al.* 2010).

Na análise de carotenóides foi observado que o isolado LGMM12 não apresentou uma boa produção, com porcentagens abaixo de 0,30% deste pigmento na biomassa seca do isolado. Como apontado por Pang *et al.* (2019), a presença de uma fonte de carbono orgânica no cultivo mixotrófico pode gerar alterações tanto no metabolismo fotossintético quanto heterotrófico das microalgas, alterando sua produtividade.

Sabe-se que espécies do gênero *Tetradesmus* apresentam capacidade para a produção destes tipos de pigmentos, como demonstrado por Gonçalves *et al.* (2019) que conseguiu extrair cerca de  $12,8 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\beta$ -caroteno de *T. acuminatus* cultivado em meio BG-11 e Singh *et. al* (2020), que obtiveram  $0,67 \text{ mg/g}$  de  $\beta$ -caroteno na biomassa seca de *T. obliquus*. Desta maneira, alterações na metodologia de cultivo para a produção de pigmentos carotenóides pelo isolado LGMM12 podem ser buscadas.

Como observado para os outros bioprodutos quantificados neste trabalho, houve uma resposta diferente do isolado aos diversos tratamentos testados, indicando que possíveis alterações nas condições de cultivo, como luminosidade, pH, temperatura e outras concentrações de nutrientes, assim como meios de cultivo diferentes, podem ser uma alternativa para potencializar a produção de macromoléculas de interesse (FIGURA 12).

FIGURA 12: PORCENTAGEM DE BIOPRODUTOS RECUPERADOS NA BIOMASSA SECA DE CADA TRATAMENTO APÓS 16 DIAS DE CULTIVO EM MEIO DE CULTURA ALTERADO.



FONTE: A autora (2020).



## 6. CONCLUSÕES

- A identificação do isolado LGMM12 por meio de análises morfológicas indica que o isolado pertence ao gênero *Tetradasmus* apresentando características como formato fusiforme, formação de cenóbios e forma de disposição das células no cenóbio. Foram observadas características que o diferenciam das demais espécies descritas para o gênero, indicando que o isolado LGMM12 é uma nova espécie do gênero *Tetradasmus*.
- Corroborando os resultados da análise morfológica, na análise molecular o isolado LGMM12 formou um ramo isolado na árvore filogenética gerada por inferência Bayesiana, utilizando o modelo Kimura 2 parâmetros com sequências da região ITS. Dando mais suporte à proposta de que o isolado LGMM12 é uma nova espécie do gênero *Tetradasmus*.
- Foi observado que o isolado LGMM12 possui potencial para produção de carboidratos, lipídeos e clorofila. Sendo que a produção de carboidratos foi superior a 30% na biomassa seca de 9 tratamentos testados e o controle. Para a produção de lipídeos a condição 2, composta por 10g/L de glicerol e a metade das concentrações de fósforo e nitrogênio possibilitou a recuperação de 26% de lipídeos na biomassa seca. Para a produção de clorofila, a condição 8, composta pelo dobro da concentração de nitrogênio e concentrações padrão de fósforo e carbono possibilitou a recuperação de 2,83% de clorofila na biomassa seca do isolado.
- As condições de cultivo 4 e 6 apresentam maior produtividade de biomassa quando comparadas ao controle. A condição 4, composta por 5 g/L de C, 2x [ ] de N e ½ [ ] de F apresentou produtividade de 0,09 g/ L / dia de biomassa. A condição 6, composta por 5 g/L de C, 2x [ ] de N e 2x [ ] de F apresentou produtividade de 0,10 g/ L / dia de biomassa.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

As variações de produtividade de macromoléculas nas diferentes condições de cultivo testadas neste trabalho indicam a possibilidade de modulação da produtividade do isolado LGMM12. O isolado se mostrou promissor para produção principalmente de carboidratos, todavia, encontrar a condição ideal de cultivo para aumentar a produção de lipídeos e pigmentos pode ser o foco de estudos futuros.

Como também análises de produção de proteínas, assim como a identificação dos tipos de lipídeos e carboidratos que o isolado produz são áreas a serem exploradas para o isolado LGMM12.

Concomitantemente com análises de diferentes concentrações de nutrientes, a alteração de condições como luminosidade e pH também podem ser promissoras na busca por uma condição de cultivo ideal para o isolado LGMM12.

Além das alterações no cultivo, técnicas de manipulação genética, como transformação genética e CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) também podem ser aplicadas para aumentar a produtividade e facilitar a extração ou secreção dessas moléculas de interesse.

## REFERÊNCIAS

- AN S.S., FRIEDL T., HEGEWALD E. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. **Plant Biology**. V. 1, p. 418–428, 1999.
- ANDERSEN, R. A. Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 91, n. 10, p. 1508-1522, 2004.
- ATKINSON JR, A. W.; GUNNING, B. E. S.; JOHN, P. C. L. Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry, and incorporation of <sup>14</sup>C-acetate, studied in synchronous cultures. **Planta**, v. 107, n. 1, p. 1-32, 1972.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais: Potencialidades e desafios do cultivo. **IAPAR**, v. 1, Londrina:, 2014.
- BALDAUF, S. L., MANHART, J. R., PALMER, J. D. Different fates of the chloroplast tufA gene following its transfer to the nucleus in green algae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 87:5317-5321, 1990.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. General overview. In: Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. Boca Raton: **Taylor & Francis**, 2006b. p. 1-34.
- BAHADAR A., KHAN M. B. Progress in energy from microalgae: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, **Elsevier**, 2013.
- BECKER E.W. Microalgae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, 25 207–210, 2007.
- BERMAN-FRANK, I.; DUBINSKY, Z. Balanced growth and aquatic plants: Myth or reality? Phytoplankton use the imbalance between carbon assimilation and biomass production to their strategic advantage. **Bioscience** 1999, 49, 29–37.
- BELLINGER E. G., SIGEE D. C. Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators. **Journal of Applied Phycology**, Stadtländer, (2010).25(4), 1265–1266.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Gêneros de algas continentais do Brasil. São Carlos, **Rima**, p. 508, 2006.
- BLIGH, E.G.;DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**,v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.
- BOX G. E. P., BEHNKEN D. W. Simplex-Sum Designs: A Class of Second Order Rotatable Designs Derivable From Those of First Order. **The Annals of Mathematical Statistics**. Volume 31, Number 4 (1960), 838-864.
- BOZARTH A., MAIER U-G., ZAUNER S. Diatoms in biotechnology: modern tools and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 195–201, 2009.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248–254, 1976.

BREUER G., DE JAEGER L., VERBEEK R.E., DRAAISMA R.B., MARTENS D.E., SPRINGER, J., EGGINK G. *et al.* Superior triacylglycerol (TAG) accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus*: (I) mutant generation and characterization. **Biotechnology for Biofuels**. V. 7, p. 69, 2014.

BROWN M.R., JEFFREY S.W. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae- Amino acids, sugars and pigments. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 161, 91-113, 1992.

BUCHHEIM, M. A., CHAPMAN, R. L. Phylogeny of the colonial green flagellates: a study of 18S and 26S rRNA sequence data. **Biosystems** 25:85-100, 1991.

BUCHHEIM, M. A., KELLER, A., KOETSCHAN, C., FÖRSTER, F., MERGET, B., WOLF, M. Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: towards an automated reconstruction of the green algal tree of life. **PLoS One** 6:ed. 16931, 2011.

BUONO S., COLUCCI A., ANGELINI A., LANGELLOTTI A. L., MASSA M., MARTELLO A., FOGLIANO V., DIBENEDETTO A. Productivity and biochemical composition of *Tetradismus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum*: effects of different cultivation approaches. **Journal of Applied Phycology**, 2016.

CARRERES B. M., JAEGER L. DE, SPRINGER J., BARBOSA M. J., BREUER G., VAN DEN END E. J., KLEINEGRIS D. M. M., SCHÄFFERS I., WOLBERT E. J. H., ZHANG H., LAMERS P. P., DRAAISMA R. B., MARTINS S. V. A. P., WIJFFELS R. H., EGGINK G., SCHAAP P. J., MARTENS D. E. Draft Genome Sequence of the Oleaginous Green Alga *Tetradismus obliquus* UTEX 393. **Genome Announcement**, v. 5(3), 2017.

CBOL PLANT WORKING GROUP, HOLLINGSWORTH, P. M., FORREST, L. L., SPOUGE, J. L., HAJIBABAEI, M., RATNASINGHAM, S., VANDER BANK, M., CHASE, M. W., COWAN, R. S., ERICKSON, D. L., FAZEKAS, A. J., GRAHAM, S. W., JAMES, K. E., KIM, K. J., KRESS, W. J., SCHNEIDER, H., VAN ALPHENSTAHL, J., BARRETT, S. C., VAN DEN BERG, C., BOGARIN, D., BURGESS, K. S., CAMERON, K. M., CARINE, M., CHACÓN, J., CLARK, A., CLARKSON, J. J., CONRAD, F., DEVEY, D. S., FORD, C. S., HEDDERSON, T. A., HOLLINGSWORTH, M. L., HUSBAND, B. C., KELLY, L. J., KE-SANAKURTI, P. R., KIM, J. S., KIM, Y. D., LAHAYE, R., LEE, H. L., LONG, D. G., MADRIÑÁN, S., MAURIN, O., MEUSNIER, I., NEWMASER, S. G., PARK, C. W., PERCY, D. M., PETERSEN, G., RICHARDSON, J. E., SALAZAR, G. A., SAVOLAINEN, V., SEBERG, O., WILKINSON, M. J., YI, D. K. & LITTLE, D. P. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 106:12794-12797, 2009.

CHENG R., MA R., LI K., RONG H., LIN X., WANG Z., YANG S., MA Y.  
*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae  
*Schizochytrium*. **Microbiological Research**. 167(3):179-86, 2012.

CHEN C.-Y., ZHAO X.-Q., YEN H.-W., HO S.-H., CHENG C.-L., LEE D.-J., BAI F.-W.,  
CHANG J.-S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical  
Engineering Journal** ; 78, 1– 10, 2013.

CHU, S. P. The Influence of the mineral composition of the medium on the growth of  
planktonic algae: Part I. Methods and culture media. **Journal of Ecology**, v. 30, n. 2,  
p. 284–325, 1942

COMAS, A.; KOMÁREK, J. Taxonomy and nomenclature of several species of  
*Scenedesmus* (Chlorellales). **Algological Studies/Archiv für  
Hydrobiologie**, supp.67, p. 135-157, 1984.

CORRÊA, D. O. et al. Enhanced biohydrogen production from microalgae by diesel  
engine hazardous emissions fixation. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.  
42, n. 33, p. 21463–21475, 2017.

COSTA A., BARBOSA G. M. C., MIYAZAWA M., GOMES P. C., GATT I. C. A.  
Ambiente de Crescimento de Microalgas In: Microalgas de Águas Continentais:  
Potencialidades e Desafios do cultivo. Vol. 1, **Instituto Agrônômico do Paraná**,  
Londrina 2014, p. 143 - 175.

DANESI, E. D. G., RANGEL-YAGUI, C. O., CARVALHO, J. C. M., SATO, S. Effect of  
reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina  
platensis*. **Biomass and Bioenergy**, 26(4), (2004), 329-335.

DAUTOR Y., UBEDA-MINGUEZ P., CHILEH T., GARCIA-MAROTO F., ALONSO D.  
L. Development of genetic transformation methodologies for an industrially-promising  
microalga: *Scenedes musalmeriensis*. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 2551–2558,  
2014.

DERNER R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição  
bioquímica das microalgas *Chaetoceros muellei* e *Thalassiosira fluviatilis*, com  
ênfase no teor de ácidos graxos poli- insaturados**. 2006. 158 f. Tese (Doutorado  
em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina,  
Florianópolis, 2006.

DI CAPRIO F., ALTIMARI P., IAQUANIELLO G., TORO L., PAGNANELLI F. *T.  
obliquus* Mixotrophic Cultivation in Treated and Untreated Olive Mill Wastewater.  
**Chemical Engineering Transactions**. V. 64, 2018.

DI CAPRIO F., ALTIMARI P., IAQUANIELLO G., TORO L., PAGNANELLI F.  
Heterotrophic cultivation of *T. obliquus* under non-axenic conditions by uncoupled  
supply of nitrogen and glucose, **Biochemical Engineering Journal**, 2019.

DOMOZYCH D.S., CIANCIA M., FANGEL J.U., MIKKELSEN M.D., ULVSKOV P., WILLATS W.G.T. The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. **Frontiers in Plant Science**. V. 3, p. 82, 2012.

DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J., REBERS, P., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28(3), p. 350–356, 1956.

DUFOSSÉ L., GALAUP P., YARON A., ARAD S. M., BLANC P., MURTHY K.N. C., RAVISHANKAR G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 389–406, 2005.

DUNAHAY, T. G., JARVIS, E. E., DAIS, S. S., AND ROESSLER, P. G. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. In **Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**,. pp. 223-231, 1996.

EVANS, K. M., WORTLEY, A. H., MANN, D. G. An assessment of potential diatom “barcode” genes (*cox1*, *rbcL*, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). **Protist**. V. 158, p. 349-364, 2007.

FAMA, P., WYSOR, B., KOOISTRA, W. H. C. F., ZUCCARELLO, G. C. Molecular phylogeny of the genus *Caulerpa* (Caulerpales, Chlorophyta) inferred from chloroplast *tufA* gene. **Journal of Phycology**. V. 38, p. 1040-1050, 2002.

FENG P., DENG Z., FAN L., HUZ. Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. V. 114, p. 405–410, 2012.

FERNÁNDEZ E., SCHNELL R., RANUM L.P. Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**.; v. 86(17), p. 6449-6453, 1989.

FERRIGO D, GALLA G, SFORZA E, MOROSINOTTO T, BARCACCIA G, BERRINI CC. Biochemical characterization and genetic identity of an oil- rich *Acutodesmus obliquus* isolate. **Journal of Applied Phycology**. V. 27, p. 149–161, 2015.

FIELDS M. W. , HISE A. , LOHMAN E. J. , BELT. L, GARDNER R.D. , CORREDOR L. , MOLL K. , PEYTON B. M. , CHARACKLIS G. W. , GERLACH R. Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**; V. 98, p. 4805–4816, 2014.

FLEURENCE J., MASSIANI L., GUYADER O., MABEAU S. Use of enzymatic cell wall degradation for improvement of protein extraction from *Chondrus crispus*, *Gracilaria verrucosa* and *Palmaria palmata*. **Journal of Applied Phycology**, 1995.



FOTT B., KOMÁREK J. Die Gattungen *Lauterborniella* SCHMIDLE und *Tetradismus* G. M. SMITH und ihre Stellung in der Familie der Scenedesmaceae (Chlorococcales) Rody Lauterborniella SCHMIDLE a *Tetradismus* G. M. SMITH a jejich postavení v rámci Scenedesmaceae (Chlorococcales). **Preslia, Praha**, v. 46, p. 198-209, 1974.

KOMÁREK J, FOTT, B. Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung Chlorococcales. In: Das Phytoplankton des Süßwassers 7. **Schweizerbart**, Stuttgart, 1983.

FUČÍKOVÁ, K., RADA, J. C., LUKEŠOVÁ, A., LEWIS, L. A. Cryptic diversity within the genus *Pseudomuriella hanagata* (Chlorophyta, Chlorophyceae, Sphaeropleales) assessed using four Barcode markers. **Nova Hedwigia**, v. 93, p. 29-46, 2011.

GAO B., LIU J., ZHANG C., VAN DE WAAL D. B. Biological stoichiometry of oleaginous microalgal lipid synthesis: The role of N:P supply ratios and growth rate on microalgal elemental and biochemical composition. **Algal Research**. V. 32, p. 353–361, 2018.

GODINHO, L. R.; GONZÁLEZ A. A. C.; BICUDO, C. E. M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 30: Chlorophyceae (família Scenedesmaceae). **Hoehnea**, v. 37, p. 513-553, 2009.

GONCALVES V. D., FAGUNDES-KLEN M. R., TRIGUEROS D. E. G., KROUMOV A.D., MODENES A. N. Statistical and optimization strategies to carotenoids production by *Tetradismus acuminatus* (LC192133.1) cultivated in photobioreactors. **Biochemical Engineering Journal**. V. 152, 2019.

GORMAN, D.S.; LEVINE, R.P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 54, p. 1665-1669, 1965.

GRAMA B. S., CHADER S., KHELIFI D., STENUIT B., JEFFRYES C., AGATHOS S. N. Characterization of fatty acid and carotenoid production in an *Acutodesmus* microalga isolated from the Algerian Sahara. **Biomass and Bioenergy**, v. 69, p. 265 - 275, 2014.

GUIRY, M. D., GUIRY, G. M. **World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. AlgaeBase**. <http://www.algaebase.org>. 2015.

GUO, S. L. *et al.* Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 61–68, 2013.

HALL, J. D., FUČÍKOVÁ, K., LO, C., LEWIS, L. A., KAROL, K. G. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. **Cryptogamie Algologie**, v. 4, p. 529-555, 2010.

HANYUDA T., ARAI S., UEDA K. Variability in the *rbcL* introns of *Caulerpa* algae (Chlorophyta, Ulvophyceae). **Journal of plant research**, v. 113, p. 403-413, 2000.



HARUN R., SINGH M., FORDE G.M., DANQUAH M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 1037–47, 2010.

HEBERT P. D., CYWINSKA A., & BALL S. L. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 270 (1512), p. 313-321, 2003.

HEGEWALD E., BOCK C., KRIENITZ L. A phylogenetic study on Scenedesmaceae with the description of a new species of *Pectinodesmus* and the new genera *Verrucodesmus* and *Chodatodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae). **Fottea**, v. 13, p. 149–164, 2013.

HEGEWALD, E., WOLF., M.. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) as inferred from 18S rDNA and ITS2 sequence comparisons. **Plant Systematics and Evolution**. V. 241, p. 185–91, 2003.

HO S.-H. , CHENC.-Y, CHANG J.-S.Effect of Light Intensity and Nitrogen Starvation on CO<sub>2</sub> Fixation and lipid/carbohydrate Production of an Indigenous Microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**. V. 113; P.244-252, 2012.

ISMAGULOVA T., CHEKANOV K., GORELOVA O., BAULINA O., SEMENOVA L., SELYAKH I., CHIVKUNOVAO., LOBAKOVA E., KARPOVA O., SOLOVCHENKO A. A new subarctic strain of *Tetradesmus obliquus*—part I: identification and fatty acid profiling. **Journal of Applied Phycology**, 2017.

JAEGER, L. D., VERBEEK R., DRAAISMA R.B., MARTENS D.E. , SPRINGER J., EGGINK G. , WIJFFELS R.H. . Superior triacylglycerol ( TAG ) accumulation in starchless mutants of *Scenedesmus obliquus* : ( I ) mutant generation and characterization. **Biotechnology for Biofuels**, v.7, n. 69, p. 1–11, 2014.

JAMES C. M.; AL-HINTY S.; SALMAN A. E. Growth and  $\omega$ 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. **Aquaculture, Stirling**, v. 77, p. 337-351, 1989.

JOHN D.M.; WHITTON B.A.; BROOK A.J. The Fresh- water Algal Flora of the British Isles. **Cambridge University Press**, pp. 702. Cambridge, UK, 2002.

JOHNSON, J. L., FAWLEY, M. W. AND FAWLEY, K. P. The diversity of *Scenedesmus* and *Desmodesmus* (Chlorophyceae) in Itasca State Park, Minnesota, USA. **Phycologia**. V. 46, p. 214–229, 2007.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. **Applied and Environmental Microbiology**., v. 59, p. 867–873, 1993.

KOLLER, M.; MUHR, A.; BRAUNEGG, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. **Algal Research**, v. 6, p. 52 – 63, 2014.

KOMÁREK, J., LUDVÍK, J. Die Zell wand ultrastrukturel staxonomisches Merkmal in der Gattung *Scenedesmus*. 1. Die Ultrastrukturelemente. **Algological Studies**. V.5, p. 301-333, 1971.

KOVACEVIC, G., FRANJEVIC, D., JELENCIC, B. AND KALAFATIC, M. Isolation and cultivation of endosymbiotic algae from green *Hydra* and phylogenetic analysis of 18S rDNA sequences. **Folia Biol. (Kraków)**. V.58, p. 135–143, 2010.

KRIENITZ, L., USTINOVA, I., FRIEDL, T., HUSS, V. A. R. Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family *Selenastraceae* (*Chlorophyceae*, *Chlorophyta*). **Journal of Phycology**, v. 37, p. 852-865, 2001.

KRIENITZ, L., WOLF, M., HEGEWALD, E., HEPERLE, D. Systematics of coccoid green algae: morphology vs. 18S rRNA gene phylogeny. **Journal of Phycology**, v. 38 (Suppl 1), p. 19-20, 2002.

KRIENITZ, L.; BOCK, C. Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**, v. 698, n. 1, p. 295-326, 2012.

KUMAR K., DASGUPTA C. N., NAYAK B., LINDBLAD P., & DAS D. Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. **Bioresource technology**, v. 102(8), p. 4945-4953, 2011.

LEVASSEUR W., PERRE P., POZZOBON V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. **Biotechnology Advances**. V.41, 2020.

LEBEAU, T.; ROBERT, J. M. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: current and putative products. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 60, p. 624–632, 2003.

LEÓN-BANÑARES R., GONZÁLEZ-BALLESTER D., GALVÁN A., FERNÁNDEZ E. Transgenic microalgae as green cell-factories. **Trends in Biotechnology** V .22, 2004.

LEÓN-BANÑARES R., FERNÁNDEZ E. Nuclear transformation of eukaryotic microalgae: historical overview, achievements and problems. In: LEÓN R., GALVÁN A., FERNÁNDEZ E. (eds) *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 616, 2007.

LEWIS L. A., FLECHTNER V. R. Cryptic species of *Scenedesmus* (chlorophyta) from desert soil communities of western north America. **Journal of Phycology**, V. 40, p. 1127–1137, 2004.

LI, X.; HU, H.Y.; GAN, K.; SUN, Y.X. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5494–5500, 2010.

LIANG K., ZHANG Q., GU M., CONG W..Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalgae *Chlorella* sp. **Journal of Applied Phycology**. V. 25, p. 311–318, 2012.

LÓPEZ C. V. G., GARCÍA M.C.C., FERNÁNDEZ F. G. A., BUSTOS C. S., CHISTI Y., SEVILLA J. M. F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v.101, p. 7587–7591, 2010.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. **São Carlos: Rima**, 2006. 606 p.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. V. 193, p. 265–275, 1951.

MA, R.; THOMAS-HALL, S. R.; CHUA, E. T.; ELTANAHY, E.; NETZEL, M. E.; NETZEL, G.; LU, Y.; SCHENK, P. M. LED. Power efficiency of biomass, fatty acid, and carotenoid production in *Nannochloropsis* microalgae. **Bioresource Technology**, v. 252, p. 118-126, 2018.

MACGILLIVARY M. L., KACZMARSKA I. Survey of the Efficacy of a Short Fragment of the *rbcL* Gene as a Supplemental DNA Barcode for Diatoms. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 58, p. 529 – 536, 2011.

MALVIYA S., SCALCO E., AUDIC S., VINCENT F., VELUCHAMY A., POULAIN J., WINCKER P., IUDICONE D., VARGAS C., BITTNER L., ZINGONE A., BOWLER C. Insights into global diatom distribution and diversity in the world's ocean. **PNAS**. The State University of New Jersey, New Brunswick, NJ, 2016.

MASSA M., BUONO S., LANGELLOTTI A. L., CASTALDO L., MARTELLO A., PADUANO A., SACCHI R., FOGLIANO V. Evaluation of anaerobic digestates from different feedstocks as growth media for *Tetrademus obliquus*, *Botryococcus braunii*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Arthrospira maxima*. **New Biotechnology**, v. 36, p. 8–16, 2017.

MATA T. M., MARTINS A. A., CAETANO N. S., Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews, Elsevier**, 2010.

MCDEVIT, D. C., SAUNDERS, G. W. A DNA barcode examination of the *Laminariaceae* (*Phaeophyceae*) in Canada reveals novel biogeographical and evolutionary insights. **Phycologia**, v. 49, p.235-248, 2010.

METTING F.B. Biodiversity and application of microalgae. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. V.17, p. 477–489, 1996.

- MIKHAILYUK T., GLASER K., TSARENKO P., DEMCHENKO E., KARSTEN U. Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. **European Journal Of Phycology**. V. 54; P. 263-290, 2019.
- MORTENSEN K. Y. B.; RAINUZZO J. K.; KNUTSEN G. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* **Schiitt**. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Amsterdam, v. 122, p. 173-185, 1988.
- MULDERS K. J. M., LAMERS P. P., MARTENS D. E., WIJFFELS R.H. Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. **Journal of Phycology**, v. 50, p. 229–242, 2014.
- MUÑOZ C. F., JAEGERL., STURME M.H.J., LIP K. Y.F., OLIJSLAGERJ. W.J., SPRINGER J., E. WOLBERT J.H., MARTENS D. E., EGGINK G., WEUSTHUIS R.A., WIJFFELS R. H. Improved DNA/protein delivery in microalgae – A simple and reliable method for the prediction of optimal electroporation settings. **Algal Research**, v. 33, p. 448–455, 2018.
- MUÑOZ C. F.,STURME M.H.J., DADAMO S., WEUSTHUIS R.A. WIJFFELS R. H. Stable transformation of the green algae *Acutodesmus obliquus* and *Neochloris oleoabundans* based on *E. coli* conjugation. **Algal Research**, v. 39, 2019.
- NADZIR S.,YUSOF N.,NORDIN N.,ABDULLAH H.,KAMARI A. Optimisation of carbohydrate, lipid and biomass productivity in *Tetradesmus obliquus* using response surface methodology. **Biofuels**, 2019.
- NANDI C., BASU P., PAL R..New insights into the diversity of planktonic Chlorophytes and Charophytes from West Bengal with reports of three novel taxa from India. **Phykos**. V. 47 (2), p. 135-149, 2017.
- OLIVEIRA R. S. Família Scenedesmaceae (Chlorophyceae, Sphaeropleales) no estado de Goiás: biodiversidade e distribuição geográfica. Dissertação (Mestrado). Biodiversidade Vegetal. **Universidade Federal de Goiania**. Goiás, 2015.
- PANG N., GU X., CHEN S., KIRCHHOFF H., LEID H., ROJE S. Exploiting mixotrophy for improving productivities of biomass and coproducts of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. V. 112, p. 450–460, 2019.
- PASSOS, M. F. **Bioprospecção de Microalgas e Obtenção de Mutantes de *Tetradesmus obliquus* para a Produção de Lipídeos**. 2018. 71 f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Genética. Universidade Federal do Paraná. Paraná 2018.
- PATNAIK R., MALLICK N. Utilization of *Scenedesmus obliquus* biomass as feedstock for biodiesel and other industrially important co-products: An integrated paradigm for microalgal biorefinery. **Algal Research**. V. 12, p. 328–336, 2015.

PIGNOLET O., JUBEAU S., VACA -GARCIA C., MICHAUD P. Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. V. 40, p.781 –96, 2013.

PIRASTRU L., DARWISH M., CHU F.L., PERREAULT F., SIROIS L., SLENO L., POPOVIC R. Carotenoid production and change of photosynthetic functions in *Scenedesmus* sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. **Journal of Applied Phycology**. V.24, p. 117 –24, 2012.

POTTER, D., SAUNDERS, G. W., ANDERSON, R. A. Convergent evolution masks extensive biodiversity among marine coccoid picoplankton. **Biodiversity and Conservation**. V. 6, p. 99-107, 1997.

PULZ O., GROSS W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 65, p. 635-648, 2004.

RAEDER, U., BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, p. 17-20, 1985.

RATLEDGE C., STREEKSTRA H., COHEN Z., FICHTALID J. Downstream Processing, Extraction, and Purification of Single Cell Oils. **SCO Extraction and Processing**, p. 179-197, 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT; R. F.; EICHHORN, S. E. Biologia vegetal. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 728 p., 2001

REN H.-Y., LIU B.-F., MA C., ZHAO L., N.-Q. REN. A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production. **Biotechnology for Biofuels**. V.6, 2013.

REVIERS, B. Natureza e posição das algas na árvore filogenética do mundo vivo. In FRANCESCHINI, I. M. (ed.). Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Porto Alegre: **Artmed**, p. 19-57, 2010.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: **Blackwell Science**, 2004.

RISMANI-YAZDI H., HAZNEDAROGLU B.Z., BIBBY K., PECCIA J. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. **BMC Genomics**, v. 12, p. 148, 2011.

ROSA M. P., VARGAS J. V. C., KAVA, V. M., DIAS F. G., SAVI D., SANTOS B., BALMANT W., MARIANO A. B., SERVIENSKI A., ORDÓÑEZ J. C. Hydrogen and Compounds With Biological Activity From Microalgae. **ASME 2019 13th International Conference on Energy Sustainability**, Bellevue, Washington, USA. P. 14–17, 2019.

RUBIO F.C., CAMACHO F.G., SEVILLA J.M.F., CHISTI Y., GRIMA E. M. A Mechanistic Model of Photosynthesis in Microalgae. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, p. 459-473, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. T.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2. ed. New York, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SARTORETTO, L. M.; SALDANHA, C. W., CORDER, M. P. M. Transformação genética: estratégias e aplicações para o melhoramento genético de espécies florestais. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.861-871, 2008.

SAUNDERS, G. W., KUCERA, H. An evaluation of *rbcl*, *tufA*, *UPA*, *LSU* and *ITS* as DNA barcode markers for the marine macroalgae. **Cryptogam Algol.** V. 31, p.487-528, 2010.

SINGH N., BATGHARE A., CHOUDHURY H. B. J., GOYAL A.C, MOHOLKAR V. S. Microalgae based biorefinery: Assessment of wild fresh water microalgal isolate for simultaneous biodiesel and  $\beta$ -carotene production. **Bioresource Technology Reports**. V. 11, 2020.

SHOUP, S., LEWIS, L. A. Polyphyletic origin of parallel basal bodies in swimming cells of chlorophycean green algae (*Chlorophyta*). **Journal of Phycology**, v. 39, p. 789-796, 2003.

SMITH G. M. A monograph of the algal genus *Scenedesmus* based upon pure culture studies. **Wisconsin Academy of Sciences, Arts, and Letters**, 1916.

SMITH, G.M. *Tetrademus*, a new four-celled coenobitic alga. Bulletin of the Torrey Botanical Club. V. 40, p. 75– 87, 1913.

SOARES D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2010.

SPOLAORE P.; JOANNIS-CASSAN C.; DURAN E.; ISAMBERT A. Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, V. 101, p. 87–96, 2006.

STEPHENSON P. G.; MOORE C. M.; TERRY M. J.; ZUBKOV M. V.; BIBBY T. S. Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 615–623, 2011.

TOMASELLI L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Victoria: **Blackwell Science**, p. 3-19, 2004.

TSARENKO P.M., PETLEVANNY O.A. Addition to the diversity of algae of Ukraine. – **Algologia**, p. 1–130, 2001.



TUCHMAN, N. The role of heterotrophy in algae. In: STEVENSON, R.J., BOTHWELL, M., Lowe, R.L. (Eds.), *Algal Ecology. Freshwater Benthic Ecosystems*. **Academic Press**, San Diego, CA, USA, pp. 299-319, 1996.

TURMEL, M., OTIS, C., LEMIEUX, C. The complete mitochondrial DNA sequence of *Mesostigma viride* identifies this green alga as the earliest green plant divergence and predicts a highly compact mitochondrial genome in the ancestor of all green plants. **Molecular Biology and Evolution**. v. 19, p.24-38, 2002.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource technology**, v. 99, n. 10, p. 4021-4028, 2008.

VAN HANNEN, E. J., LURLING, M., VAN DONK, E. Sequence analysis of the ITS-2 region: a tool to identify strains of *Scenedesmus* (*Chlorophyceae*). **Journal of Phycology**. V. 36, p. 605–7, 2000.

VAN HANNEN, E. J., FINK, P., LURLING, M. A revised secondary structure model for the internal transcribed spacer 2 of the green algae *Scenedesmus* and *Desmodesmus* and its implications for the phylogeny of these algae. **European Journal of Phycology** . v. 37, p. 203–8, 2002.

VIEIRA H. H., BAGATINI I. L., GUINART C. M., VIEIRA A. A. H. *tufA* gene as molecular marker for freshwater *Chlorophyceae*. **Algae**, v. 31(2), p. 155-165, 2016.

WASE N., BLACK P., DIRUSSO C. Innovations in improving lipid production: Algal chemical genetics. **Progress in Lipid Research**. v. 71, p. 101–123, 2018.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 87, n. 12, p. 4576-4579, 1990.

WYNNE M. J., HALLAN J. K. Reinstatement of *Tetradismus* G. M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). **FeddesRepertorium**, v. 126, p. 83–86, 2015.

YAMADA T., SAKAGUCHI K. Comparative studies on *Chlorella* cell walls – induction of protoplast formation. **Archives of Microbiology**. v. 132, p. 10–13; 1982.

YEN, H.; HU, I.; CHEN, C.; HO, S.; LEE, D.; CHANG, J. Microalgae-based biorefinery--from biofuels to natural products. **Bioresource technology**, v. 135, p. 166-74, 2013.

ANEXO 1- QUADRO COMPARATIVO COMPLETO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE *Tetrademus* QUE APRESENTARAM SEQUÊNCIAS GENÉTICAS DISPONÍVEIS NO BANCO DE DADOS GENBANK.

Espécies	Genóbio	Células cenóbio	Célula Marginal	Célula Mediana	Célula Isolada	Apices	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Estria Longitudinal	Protrusões no ápice	Localização Espécie tipo	Distribuição	BRASIL	Descrição
<i>LGM12</i>	Alternado	2-4	Fusiforme	Fusiforme ou semi-lunada	Fusiforme	Cuneado	13-17,6	3,6-6	Presente	Ausente			Presente	
<i>T. acuminatus</i>	Linear	4	Lunada	Lunada	Ausente	Pontiagudo	20-36	3-4	Ausente	Ausente	China	Ásia	Ausente	Hu, 1992
<i>T. adustus</i>	Ausente	0	***	***	Esférica	Alongada	6-15	4-6	Ausente	Ausente	Mexico	América do Norte, América Central	Ausente	Terlova, Lewis, 2019
<i>T. arenicola</i>	Linear ou alternado	2-4	Semi-Lunada	Fusiforme ou semi-lunada	Esférica ou semi-lunada	Pontiagudo	Célula adulta (17,1) 19,4-29,4; célula isolada (11,1) 14,4-25 (30,6)	Célula adulta (6,7) 7,8-8,3; célula isolada (6,7) 8,3-16,7	Ausente	Ausente	Ucrânia	Europa	Ausente	Mikhailyuk et al., 2019
<i>T. bajacalifornicus</i>	Ausente	0	***	***	Elipsóide	Alongada	3-7,5	1,5-15	Presente	Presente	EUA	América do Norte, América Central, África	Ausente	Lewis, Flechtner, 2004; 2019
<i>T. bernardii</i>	Linear ou alternado	2-4-8	Fusiforme ou lunada	Fusiforme ou lunada	Ausente	Cuneado ou Pontiagudo	8-35 (48)	2,5-10	Ausente	Ausente	EUA	Ásia, Europa, Oceania	Presente	Smith, 1916
<i>T. deserticola</i>	Ausente	0	***	***	Lunada ou Semi-lunada	Alongada	7-21	8-24	Presente	Presente	EUA	EUA	Ausente	Lewis, Flechtner, 2004; 2019
<i>T. dimorphus</i>	Linear ou alternado	2-4-8	Fusiforme, Elipsóide, lunada ou semi-lunada	Fusiforme, Elipsóide ou elíptica	Ausente	Cuneado ou Pontiagudo	2-35	1,9-22	Presente	Ausente	Não informado	África, América (Norte, Central, Sul), Ásia, Europa, Oceania	Presente	Turpin, 1828
<i>T. dissociatus</i>	Anexado à parede celular da mãe	2-4-8	Elipsóide	Elipsóide	Elipsóide	Pontiagudo	8-18	44046	Ausente	Ausente	EUA	EUA	Ausente	Verses & Trainor, 1966
<i>T. distantus</i>	Linear	4	Elipsóide ou semi-lunada	Elipsóide ou semi-lunada	Ausente	Pontiagudo	13,3-20	2,6-4,6	Ausente	Ausente	Não informado	Europa	Ausente	Holtmann, 1994
<i>T. incrassatulus</i>	Linear ou alternado	2-4-8	Fusiforme semi-lunada ou lunada	Fusiforme semi-lunada ou lunada	Fusiforme semi-lunada ou lunada	Pontiagudo	6,4-25 (28)	2,4 - 14 (28)	Ausente	Presente	Brasil	África, América (Norte, Central, Sul), Ásia, Europa, Oceania	Presente	Bohlin, 1897
<i>T. nygaardii</i>	Alternado	4-8	Fusiforme ou lunada	Fusiforme ou lunada	Lunada	Cuneado	9,6-22	1,6-4,5	Ausente	Ausente	Indonésia	Europa	Ausente	Comas & Komarek, 1984
<i>T. obliquus</i>	Linear ou alternado	2-4-8	Fusiforme, Elipsóide, lunada ou semi-lunada	Fusiforme, Elipsóide	Ausente	Arredondado cuneado ou Pontiagudo	2,2-25,6	2-15	Ausente	Ausente	Eslováquia	África, América (Norte, Central, Sul), Ásia, Europa, Oceania	Presente	Turpin, 1828
<i>T. reginae</i>	Alternado	2-4	Lunada	Lunada	Ausente	Cuneado	10-11,5	2,2-3,5	Ausente	Ausente	Não informado	Europa	Ausente	Holtmann, 1994
<i>T. wisconsinensis</i>	Linear	2-4	Fusiforme, Elipsóide, lunada ou semi-lunada	Fusiforme, Elipsóide, lunada ou semi-lunada	Ausente	Cuneado ou Pontiagudo	8-26	2,1-8	Ausente	Ausente	EUA	África, América (Norte, Central, Sul), Ásia, Europa, Oceania	Presente	Smith, 1913

FONTE: A autora (2020).



ANEXO 2- QUADRO COMPARATIVO DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS ESPÉCIES DE *Tetrademus* QUE NÃO APRESENTARAM SEQUÊNCIAS GENÉTICAS DISPONÍVEIS NO BANCO DE DADOS GENBANK E O ISOLADO LGMM12.

Espécies	Cenóbio	Células cenóbio	Célula Marginal	Célula Mediana	Célula Isolada	Apices	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Estria Longitudinal	Protrusões no ápice	Distribuição	BRASIL	Descrição
<i>LGMM12</i>	Alternado	2-4	Fusiforme	Fusiforme ou semi-lunada	Fusiforme ou semi-lunada	Cuneado	13-17,6	3,6-6	Presente	Ausente		Presente	
<i>T. crocinii</i>	Linear	2-4	Elipsóide	Elipsóide	Ausente	Arredondado	(5,6) 7-15	(1,2) 2-5,5	Ausente	Ausente	Europa	Ausente	Fott, Komarek, 1974
<i>T. cumbricus</i>	Linear	4	Elipsóide ou semi-Lunada	Elipsóide	Ausente	Pontiagudo	14-30	4,2 - 13,5	Ausente	Ausente	Ásia, Europa	Ausente	West, 1915
<i>T. formosanus</i>	Linear	4	Lunada	Lunada	Ausente	Cuneado	15-18	2,5-4	Ausente	Ausente	Ásia	Ausente	Shen, 1955
<i>T. hupehensis</i>	Linear	4	Lunada	Lunada	Ausente	Cuneado	31-40	7-12	Ausente	Ausente	Ásia	Ausente	Hu, 1992
<i>T. lagerheimii</i>	Linear ou alternado	4-8	Lunada	Fusiforme	Ausente	Cuneado	5-50 (60)	2-10	Ausente	Ausente	África, America (Norte, Central, Sul), Ásia, Europa, Oceania	Presente	Lagerheim, 1882
<i>T. lunatus</i>	Linear	2-4	Lunada	Lunada	Ausente	Cuneado	6,6-21,2	1,8-7,5	Ausente	Ausente	América do Sul, Ásia, Europa	Presente	Korshikov, 1953
<i>T. major</i>	Linear	2-4	Lunada	Lunada	Ausente	Cuneado	20-32	5,5-6,5	Ausente	Ausente	Europa	Ausente	Fott, Komarek, 1974
<i>T. petkoffii</i>	Alternado	4	Lunada	Lunada	Ausente	Cuneado	12-20	3,5-5	Ausente	Ausente	Europa	Ausente	Printz, 1916
<i>T. smithii</i>	Alternado	2-8	Elíptica alongada	Elíptica	Ausente	Arredondado	4-19	3,4-13	Ausente	Ausente	América do Norte, Ásia	Ausente	Prescott, 1944

FONTE: A autora (2020).